

UNTERSUCHUNG DER ZUCKERKOMPONENTEN
IN DEM APOPROTEIN DER
D-OXYNITRILASE VON PRUNUS AMYGDALUS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Fachbereich Chemie

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GÜNTER HAAS

aus Geisa

Marburg/Lahn 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNTERSUCHUNG DER ZUCKERKOMPONENTEN
IN DEM APOPROTEIN DER
D-OXYNITRILASE VON PRUNUS AMYGDALUS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Fachbereich Chemie
der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GÜNTER HAAS

aus Geisa

Marburg/Lahn 1976

Druck : Görich & Weiershäuser, Marburg



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am.....27. 1. 1976

Tag der mündlichen Prüfung am.....11. 2. 1976

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Pfeil

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Inhaltsverzeichnis:

=====

<u>Allgemeiner Teil</u>	Seite
1. Einführung	1
2. Darstellung und Reinigung der D-Oxynitrilase	4
3. Analyse der Grundbausteine	5
3.1. Saure Hydrolyse zur Bestimmung der Zucker	6
3.2. Qualitative Analyse der Kohlenhydratbestandteile	7
3.2.1. Nachweis der Neutralzucker	9
3.2.2. Nachweis von Hexosaminen	10
3.2.3. Nachweis von Neuramin- bzw. Sialinsäure	10
3.3. Quantitative Bestimmung der Kohlenhydratbestandteile	13
4. Untersuchung der Kohlenhydrat-Protein-Bindung	14
4.1. Untersuchungsmethode zum Nachweis der O-glykosidischen Bindung über Serin und Threonin	15
4.2. Untersuchungsmethode zum Nachweis der N-Acylglucosylaminbindung	18
4.3. Protein-Kohlenhydrat-Bindung der D-Oxynitrilase	18
5. Untersuchung der Kohlenhydratketten	28
5.1. Darstellung von Glykopeptiden	31
5.1.1. Isolierung und Trennung der Glykopeptide	32
5.1.2. Ergebnisse der Aminosäureanalysen	37
5.2. Untersuchung der Zuckerketten nach Behandlung der Glykopeptide mit Alkali	41

5.3.	Die enzymatische Hydrolyse: eine Methode zur Strukturaufklärung von Oligo- bzw. Polysacchariden	42
5.4.	Durchführung und Ergebnisse der enzymatischen Hydrolysen	44
5.5.	Chromatographie der D-Oxynitrilase an Con A-Sepharose	49
6.	Diskussion	51
7.	Zusammenfassung	55

Experimenteller Teil

1.	Darstellung des Apoproteins der D-Oxynitrilase	57
1.1.	Hitzedenaturierung	57
1.2.	Säuredenaturierung	57
2.	Hydrolyse des Apoproteins zur Freisetzung der Kohlenhydrate	58
2.1.	Saure Hydrolysen	58
2.1.1.	Saure Hydrolysen zur Freisetzung von Neutralzucker	59
2.1.2.	Saure Hydrolysen zur Freisetzung von Hexosaminen	60
2.1.3.	Saure Hydrolysen zur Freisetzung von Sialinsäure	60
2.2.	Alkalische Hydrolyse mit Ba(OH) ₂	61
3.	Dünnschichtchromatographische Methoden	62
3.1.	Dünnschichtchromatographische Trennung der Zucker	62

3.2.	Dünnschichtchromatographische Trennung der Oligo- bzw. Polysaccharidketten	64
3.3.	Vergleichszucker für die chromatographische Zuckertrennung	64
4.	Entwicklung der Chromatogramme	65
4.1.	Anilinphthalat-Sprühareagenz	65
4.2.	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz	65
4.3.	Anthron-Sprühareagenz	66
4.4.	ELSON-MORGAN-Test	66
5.	Sialinsäurebestimmung	67
5.1.	Thiobarbitursäure-Test	67
5.2.	Alkali-EHRLICH-Methode	68
5.3.	Resorcin-Methode	69
6.	Quantitative Zuckerbestimmung nach DUBOIS	70
7.	Quantitative Aminosäureanalyse	71
8.	Darstellung der Glykopeptide	72
8.1.	Enzymatische Hydrolyse mit Pronase E aus Streptomyces griseus	72
8.2.	Auftrennung des enzymatischen Hydrolysates an Sephadex G 25	73
8.3.	Zweidimensionale Auftrennung der Glykopeptid- fraktionen auf Dünnschichtplatten	74
8.4.	Überprüfung der isolierten Glykopeptide auf Einheitlichkeit	76
8.5.	Hydrolyse der isolierten Glykopeptide	77
9.	Dansylierung und Trennung der dansylierten Aminosäuren	78

10.	Inkubationsbedingungen der Glykosidasen	79
10.1.	α -Glykosidase	79
10.2.	α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase	79
10.3.	α -Amylase	80
10.4.	β -Amylase	80
10.5.	β -Glucosidase	80
10.6.	β -Galaktosidase	81
11.	Glucosebestimmung mit Glucose-Oxydase und Peroxydase	81
12.	Galaktosebestimmung mit Galaktose-Dehydrogenase	82
13.	Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose	82
14.	Bezugsquellen der verwendeten Materialien	84
	Literaturverzeichnis	85

1. Einführung

Das in den Rosaceen-Unterfamilien Maloideae und Prunoideae vorkommende Enzym D-Oxynitrilase (Hydroxynitrilase E.C. 4.1.2.10) ist ein gelbes Chromoproteid mit FAD als prosthetischer Gruppe.

Es wurde erstmals 1966 von F. KROMBHOLZ (1) auf den Gehalt an Kohlenhydraten untersucht.

KROMBHOLZ beschränkte sich dabei auf das in den Samen der bitteren Mandel (*Prunus amygdalus*, Prunoideae) enthaltene Enzym. Er fand in den sauren Hydrolysaten des Holoenzymys mittels Papierchromatographie fünf verschiedene Zucker - die Aldomethylpentose Fucose, die Aldohehexosen Mannose, Glucose, Galaktose und die Aldopentose Ribose. Letztere entstammt der prosthetischen Gruppe FAD des Enzyms. Hexosamine bzw. N-Acetyl-Hexosamine wurden nicht gefunden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Enzym D-Oxynitrilase ein Glykoprotein.

Glykoproteine sind definiert als zusammengesetzte Eiweißkörper, die eine oder mehrere, häufig verzweigte, Kohlenhydratkette enthalten. Diese ist kovalent mit der Polypeptidkette verknüpft (2). Meist bestehen die Zuckerketten aus einer relativ geringen Anzahl von Monosacchariden. Bei diesen kann es sich um einfache Monosaccharide, Hexosamine, N-Acetyl-Hexosamine oder Neuramin - bzw. Sialinsäuren handeln. Für die kovalente Bindung zwischen Zuckerkette und Protein sind bisher nur zwei Typen gefunden worden:

Typ a. O-glykosidische Verknüpfung zwischen Zucker und den OH-Gruppen der Hydroxyaminosäuren Serin (Abb. 1), Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin.

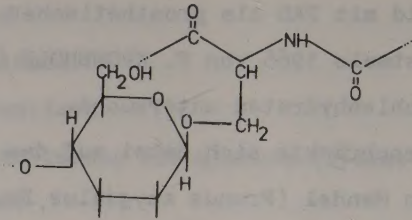


Abb. 1 : O-glykosidische Bindung zwischen Serin und Zuckerrest

Die Bindung von Typ a über Hydroxylysin ist allerdings auf die Strukturproteine, speziell die Collagene beschränkt. Proteine, welche die Zuckerkette an Hydroxyprolin gebunden enthalten, kommen in der primären Zellwand grüner Pflanzen vor (3).

Typ b. N-glykosidische Bindung zwischen Amino-Zucker und der Amidgruppe des Asparagins.

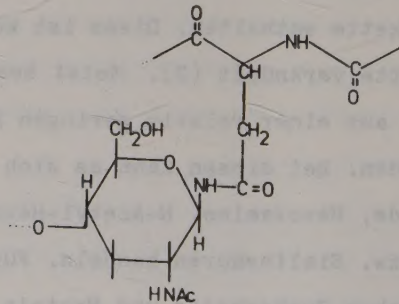


Abb. 2 : N-glykosidische Bindung zwischen Asparagin und N-Acetylglucosamin

Ein möglicher dritter Bindungstyp, die Esterglykosidbindung, zwischen Zucker und der β - bzw. γ -Carboxylgruppe von Asparagin- bzw. Glutaminsäure scheidet wegen seiner Labilität aus (4).

In der folgenden Tabelle sind die bisher bekannten Komponenten der Kohlenhydrat-Proteinbindungen zusammengestellt.

Tab. 1: Zusammenstellung der an Kohlenhydrat-Proteinbindungen beteiligten Aminosäuren und Monosacchariden

<u>Aminosäure</u>	<u>Monosaccharid</u>
Asparagin	N-Acetyl-Glucosamin
Serin	N-Acetyl-Galaktosamin
	Galaktose
	Mannose
	Xylose
Threonin	N-Acetyl-Galaktosamin
	Galaktose
	Mannose
Hydroxylysin	Galaktose
Hydroxyprolin	Arabinose

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, einen Einblick in die Zusammensetzung und Struktur der Kohlenhydratkomponenten der D-Oxynitrilase aus *Prunus amygdalus* zu ermitteln.

Da dieses Enzym aus drei Isoenzymen besteht, wird sowohl das Apoprotein des Isoenzymgemisches, als auch teilweise die Apoproteine der einzelnen Isoenzyme untersucht.

Die Arbeit läßt sich im wesentlichen in folgende Abschnitte gliedern:

- a. Darstellung eines hochgereinigten Untersuchungsmaterials
- b. Analyse seiner Grundbausteine
- c. Untersuchung der Protein-Kohlenhydrat-Bindung und
- d. Strukturuntersuchung an den Oligosaccharidketten.

2. Darstellung und Reinigung der D-Oxynitrilase

Die Reindarstellung der D-Oxynitrilase erfolgte nach dem modifizierten Verfahren von K.H. MEHNER (5).

Bittermandelkleie wird mit wäßrigem Ammoniak extrahiert, der Extrakt mit verdünnter Essigsäure auf pH 5,4 angesäuert, zentrifugiert und das Zentrifugat in einer Ultrafiltrationszelle eingeengt. Innerhalb von zwei Tagen erhält man eine ankonzentrierte Lösung, die neben D-Oxynitrilase weitere Proteine, z.B. Phosphatase und β -Glucosidase enthält (6).

Anschließend filtrierte ich das Konzentrat über eine 2m lange Säule an Sephadex G 100 mit 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5. Nach viermaliger Gelfiltration erhält man so eine Enzymfraktion, die in der Disc-Elektrophorese keinerlei Eiweißverunreinigungen mehr zeigt. Dieses Enzymgemisch besteht aus drei Isoenzymen, die nach einem Verfahren von H.J. ASCHOFF (7) an Whatmann-Cellulose-Ionenaustauscher DE 32 präparativ getrennt werden können.

Die Apoproteine lassen sich entweder durch Hitze-denaturierung oder durch Säuredenaturierung mit 1N H_2SO_4 darstellen. Dabei wird die prosthetische Gruppe FAD irreversibel abgespalten. Bei der Abspaltung des FAD macht sich dessen starke Fluoreszenz im UV-Licht bemerkbar, die zur Überprüfung der Vollständigkeit der Abspaltung und des Reinheitsgrades benutzt werden kann.

3. Analyse der Grundbausteine

Den ersten Schritt bei Untersuchungen an Glykoproteinen bildet eine Zerlegung des Biopolymers in seine Grundbausteine und deren qualitative und quantitative Analyse.

Hierbei treten in vielen Fällen Komplikationen auf, die auf eine teilweise Zerstörung von Aminosäuren und Zucker oder eine unvollkommene Hydrolyse von bestimmten Untereinheiten zurückzuführen sind. Weitere Komplikationen werden durch irreversible Reaktionen von Aminosäuren mit Monosacchariden hervorgerufen, wobei als wichtigste Nebenprodukte Huminsäuren entstehen. Hier handelt es sich um lösliche und unlösliche gelb-braun bis schwarz gefärbte polymere Substanzen, die die analytischen Untersuchungen der Hydrolysate erheblich erschweren können. Ihre Bildung verläuft über verschiedene Zwischenstufen:

-N-substituiertes Glykosylamin, Hydroxymethylfurfural und eine Reihe weiterer z.T. noch nicht identifizierter Folgeprodukte - die über Kondensationen und Polymerisationen das Endprodukt bilden (8).

Im Rahmen dieser Arbeit ist auf eine Aminosäureanalyse der Apoproteine verzichtet worden, da sie bereits von H.J. ASCHOFF (7) und V. MÄTZKE (9) durchgeführt wurden.

3.1. Saure Hydrolyse zur Bestimmung der Zucker

Wie oben bereits erwähnt, rufen die H^+ -katalysierten Nebenreaktionen während der Hydrolyse von Glykoproteinen beachtliche Schwierigkeiten hervor. Die für eine bestimmte Spaltung gewählte Säurekonzentration kann bei den einzelnen Monosacchariden zu unterschiedlich starker Zerstörung führen. Temperatur und Dauer der Hydrolyse spielen dabei ebenfalls eine wichtige Rolle. Daher müssen zunächst die Reaktionsbedingungen experimentell ermittelt werden, bei denen man die höchsten Ausbeuten an Zucker erhält.

Während zur vollständigen Freisetzung von Hexosen und Pentosen relativ geringe Säurekonzentrationen genügen, muß man zur Abspaltung von Aminozuckern drastischere Bedingungen wählen; in der Regel verwendet man 4 - 6 N Säure und Temperaturen um $100^{\circ}C$. Die Hydrolysedauer ist hier allerdings auf 3 - 4 h zu beschränken, da sonst eine zu starke Zerstörung der Hexosamine auftritt.

N-Acetyl-Hexosamine werden bei der sauren Hydrolyse deacyliert und in die entsprechenden Hexosamine überführt. Für die Hydrolyse der D-Oxynitrilase haben sich

folgende Hydrolysebedingungen bewährt:

- a. Freisetzung der Neutralzucker 1N HCl, 6 h, 100° C
- b. Freisetzung der Neutralzucker 2N HCl, 4 h, 80° C
- c. Freisetzung der Hexosamine 6N HCl, 3 h, 100° C

In den Hydrolysaten trat stets Huminbildung auf. Sie war bei den mit 6 N HCl durchgeführten Hydrolysaten am stärksten. Durch Spülen der Hydrolyseröhrchen mit gereinigtem Stickstoff unter gleichzeitigem Kühlen der Proben in flüssiger Luft und anschließendem Zuschmelzen konnte die Huminbildung beträchtlich vermindert werden. Eine weitere Herabsetzung der Huminbildung wurde durch Anwendung eines 200-500-fachen Säureüberschusses (bezogen auf das Protein) erzielt. Durch diese Maßnahme erreicht man eine relativ starke Verdünnung der Zucker und Aminosäuren im Hydrolysat (10).

Nach erfolgter Umsetzung wurden die Hydrolysate mittels Ionenaustauschern von Säurespuren und anderen Ionen befreit, auf 0,1 - 0,2 ml eingeeengt und chromatographisch untersucht.

3.2. Qualitative Analyse der Kohlenhydratbestandteile

Für die qualitative Untersuchung der Kohlenhydratbestandteile wurden Dünnschichtfolien oder Glasplatten mit Kieselgel verwendet.

Die Dünnschicht - Chromatographie bietet sich besonders an, da mit dieser Methode geringste Mengen in relativ kurzer Zeit getrennt werden können. Bei Verwendung geeigneter Entwickler läßt sich die Erfassungsgrenze gegenüber Cellulose - Schichten um zwei Zehner-

potenzen verbessern (11).

Zur Trennung der Kohlenhydratbestandteile sind folgende Fließmittel benutzt worden:

- a. n-Butanol/Eisessig/Diäthyläther/ H_2O (9:6:3:1; v/v)
- b. n-Butanol/Äthanol/ H_2O (5:3:2; v/v)
- c. Aceton/ H_2O (9:1; v/v)
- d. Pyridin/Äthylacetat/Eisessig/ H_2O (5:5:1:3; v/v)

Um eine gute Aufteilung der Zucker zu erzielen, wurde die Mehrstufentechnik auf acetatgepufferten Schichten angewendet, d.h. zweimaliges eindimensionales Chromatographieren. Man benutzt dabei entweder zweimal das gleiche oder verschiedene Fließmittel.

Die Sichtbarmachung der Zuckerflecken erfolgte nach vier Methoden:

1. mit Anilinphthalat, das mit Zucker unter Bildung brauner, im UV-Licht hellgrün fluoreszierender Flecken reagiert,
2. mit Anisaldehyd- H_2SO_4 -Reagenz. Hierbei entstehen für die einzelnen Zucker charakteristische Farbflecken,
3. mit Anthron-Reagenz für den Nachweis von Ketosen
4. mit dem ELSON-MORGAN-Test für den spezifischen Nachweis von Hexosaminen.

Die Identifizierung der im Hydrolysat befindlichen Zucker erfolgte über die R_f -Werte. Als Vergleichszucker wurden eingesetzt (geordnet nach steigenden R_f -Werten):

Tab. 2 : Für die Chromatographie verwendete
Vergleichszucker

D-(+)-Galaktosamin. HCl

D-(+)-Glucosamin. HCl

D-(+)-Galaktose

D-(+)-Glucose

D-(-)-Fructose

D-(+)-Mannose

L-(+)-Arabinose

L-(-)-Sorbose

D-Fucose

D-(-)-Ribose

D-(+)-Xylose

3.2.1. Nachweis der Neutralzucker

Die chromatographische Auswertung der Hydrolysate zeigte zunächst zwei unterschiedliche Ergebnisse, je nachdem welches Ausgangsmaterial eingesetzt wurde.

Wie bereits unter 1. angeführt, enthält das Enzym FAD als prosthetische Gruppe. Führt man die Hydrolysen mit dem Holoenzym durch, erhält man nach Entwicklung der Chromatogramme fünf Flecken. Sie stimmen in ihren R_f -Werten und Fluoreszenzverhalten mit den Vergleichszuckern Fucose, Mannose, Ribose, Galaktose und Glucose überein. Hydrolysate des Apoproteins ergeben jedoch nur zwei Flecken (s. Abb. 3). Sie sind identisch mit den Hexosen Glucose und Galaktose, wobei sich der Gehalt an Galaktose aufgrund der Fleckgröße eindeutig als

niedriger erweist. In einem zusätzlichen Experiment wurde reines FAD unter gleichen Bedingungen hydrolysiert. Die Chromatogramme dieser Hydrolysate zeigten drei Flecken. Sie waren in ihren R_f -Werten identisch mit Ribose, Mannose und Fucose. Bei den beiden zusätzlichen Flecken handelte es sich offenbar um Abbauprodukte des FAD wie Lumichrom und Lumiflavin.

Die Ergebnisse von Krombholz (1) finden so eine einfache Erklärung.

(Abb. 3 s. S. 11)

3.2.2. Nachweis von Hexosaminen

Neben den Reaktionen mit Anilinphthalat und Anisaldehyd- H_2SO_4 wurden der Thiobarbitursäure-Test (12) und der ELSON - MORGAN - Test (13) für den speziellen Hexosamin-Nachweis durchgeführt. In keinem der 6 N-HCl-Hydrolysate waren aufgrund dieser Tests Hexosamine nachzuweisen.

3.2.3. Nachweis von Neuramin- bzw. Sialinsäure

Neuraminsäure bzw. ihre acylierten Derivate, die Sialinsäuren, sind innerhalb des Tierreiches weit verbreitet. Ihr Auftreten in Pflanzen mit Ausnahme der Bakterien ist noch umstritten. L. WARREN (14) berichtet, daß in höheren Pflanzen, Farnen, Moosen, Flechten, Algen und Pilzen bisher keine Sialinsäuren gefunden werden konnten. F. C. MAYER et al. (15) und K. ONODERA et al. (16) glaubten dagegen in Sojabohnen, Luzernensamen und anderer Pflanzenextrakten aufgrund spezifischer optischer Tests Sialinsäure nachgewiesen zu haben. Wie schließlich

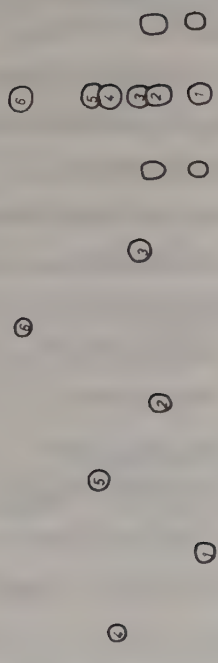


Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm eines sauren Hydrolysates der D-Oxynitrilase aus *Pr. amygdalus* (Isoenzymgemisch) (Auftrennung auf kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien (60 F 254, Merck) unter Anwendung der Mehrstufentechnik
 Fließmittel 1: n-Butanol : Äthanol : H₂O (5:3:2; v/v)
 Fließmittel 2: Aceton : H₂O (9:1 v/v)
 Entwickler: Anilinphthalat

GIELEN (17) zeigte, handelte es sich bei den Verbindungen aus Sojabohne und Hydrolysaten von Bananenfrüchten nicht um Sialinsäuren sondern um andere 2-Keto-3-deoxyaldonsäuren.

Sialinsäure tritt als Baustein glykosidisch gebunden in Oligo-, Homo- oder Heteropolysacchariden, Glykolipiden und Glykoproteinen auf. In diesen Verbindungen ist sie ausschließlich ketosidisch an Galaktose (an C-Atom 3 oder 6), an N-Acetyl-Galaktosamin (C 6) oder an eine weitere Sialinsäure-Einheit (an C-Atom 8) geknüpft (8). Sialinsäure wird unter den üblichen Hydrolysebedingungen zerstört. Für ihre Abtrennung und ihren Nachweis sind deshalb schonende Methoden erforderlich. Die Hydrolyse erfolgte entweder mit 0,1 N H_2SO_4 bei 80° C eine Stunde lang oder über die gleiche Zeit bei 90° C mit 0,05 N H_2SO_4 . Anschließend wurde das Hydrolysat gefiltert und das Filtrat über den stark basischen Ionenaustauscher Dowex 1 X 8 (200-400 mesh, Acetat-Form) gegeben und zweimal mit 5 ml Aqua dest. nachgespült. Die Elution führte ich mit 8 ml 1 M Essigsäure-Acetatpuffer pH 4,6 durch.

Die Sialinsäure-Bestimmung im Eluat erfolgte nach drei verschiedenen Methoden:

1. dem Thiobarbitursäure - Test (modifiziert für Sialinsäure-Bestimmung) (18),
2. der Alkali-EHRLICH-Methode (18),
3. der Resorcin-Methode (19).

In allen drei Fällen verlief der Sialinsäure-Nachweis negativ.

Zusätzlich wurde eine enzymatische Hydrolyse des Apoenzyms mit Neuraminidase aus Clostridium perfringens durchgeführt. Auch in diesem Hydrolysat war keine Sialinsäure nachweisbar.

3.3. Quantitative Bestimmung der Kohlenhydratbestandteile

Für die quantitative Zuckerbestimmung wurden die Apoproteine der Isoenzyme und des Isoenzymgemisches drei Tage im Vakuum über festem KOH getrocknet, um den Wasseranteil in den Proteinen möglichst gering zu halten. Die Gesamtanalyse, nach der Methode von DUBOIS et al (20) mit 80%iger (g/g) wässriger Phenollösung und konz. H_2SO_4 durchgeführt, ergab, das in Tabelle 3 dargestellte Resultat:

Tab. 3 : Zuckergehalt im Apoenzym der Oxynitrilase

Apoenzym	Zuckergehalt in %	Verhältnis Glu:Gal	Isoenzymanteil im Iso.-Gem. in % (6)
Isoenzym I	$2,8 \pm 0,5\%$	2 : 1	7
Isoenzym II	$2,2 \pm 0,5\%$	2 : 1	53
Isoenzym III	$2,3 \pm 0,5\%$	2 : 1	40
Isoenzymgem.	$2,8 \pm 0,5\%$	2 : 1	

Zur Bestimmung des Verhältnisses von Glucose zu Galaktose wurden die Zucker dünnschichtchromatographisch getrennt und die Flecken von den Platten abgekratzt. Das abgekratzte Material habe ich dann mit 5 ml Aqua dest. aufgeschlämmt und abfiltriert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Arbeitsschrittes und Einengung der vereinigten Filtrate auf 2 ml erfolgte die quantitative Bestimmung. Der Kohlenhydratanteil von 2,8 % im Isoenzymgemisch liegt etwas zu hoch. Der theoretische Wert sollte etwa bei 2,4% liegen. Berücksichtigt man jedoch die bei den Bestimmungen auftretende Streuung der Werte um 0,5 %, so ist dieser Wert noch hinreichend genau.

4. Untersuchung der Kohlenhydrat - Protein - Bindung

In Kap. 1 sind zwei Typen der Kohlenhydrat - Protein - Bindung in Glykoproteinen angeführt: die O - glykosidische Bindung über die Hydroxy-Aminosäuren Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin und die N-Acylglucosylamin-Bindung über die Amidgruppe der Aminosäure Asparagin.

Während Bindungen von Oligosaccharidketten über Hydroxyprolin und Hydroxylysin auf pflanzliche bzw. tierische Strukturproteine beschränkt zu sein scheinen, sind solche über Serin, Threonin und Asparagin ziemlich regellos über alle Species von Glykoproteinen, wie z.B. die Albumine des Hühnereiweißes, die γ -Globuline des Menschen, die Hämagglutinine von Leguminosen usw. verteilt.

Entwicklungsgeschichtlich bemerkenswert ist dabei die Tatsache, daß sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Glykoproteinen derselbe Typ der Kohlenhydrat - Protein - Bindung mit den daran beteiligten Zuckern verbreitet ist (vgl. Kap. 1).

Innerhalb eines Glykoproteins können auch zwei verschieden aufgebaute Oligosaccharidketten über zwei unterschiedliche Bindungstypen mit dem Proteinteil verbunden sein, wie Arbeiten von G. DAWSON und J. R. CLAMP (21) gezeigt haben.

Gegenüber Säuren und Laugen besitzen die beiden Bindungstypen unterschiedliche Stabilität. Während die N-Acylglucosylamin-Bindung im sauren und alkalischen Milieu relativ stabil ist, wird die O-glykosidische Bindung über Serin und Threonin bereits unter milden sauren und alkalischen Bedingungen gespalten (8). Diese unterschiedliche Stabilität bildet die Basis für die Untersuchung der Protein - Kohlenhydratbindung.

4.1. Untersuchungsmethode zum Nachweis der O -gly- kosidischen Bindung über Serin und Threonin

Ein eindeutiger Nachweis der O-glykosidischen Bindung über die Aminosäuren Serin und Threonin wurde 1964 von einigen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ausgearbeitet. Ihr Ausgangspunkt war die von R. KUHN (22) und S.U. ISBELL (23) gemachte Beobachtung, daß O-glykosidische Bindungen in β -Stellung zu einer Carbonylgruppe alkalilabil sind. Verbindungen dieses Typs zerfallen in alkalischem Milieu in den Zuckeran-

teil und das α - β -ungesättigte Aglykon, analog der basenkatalysierten Wasserabspaltung aus Aldolen. Entsprechendes wurde bei Glykopeptiden festgestellt. Hier registrierte man eine Abnahme des Serin- und Threoninegehaltes und das Auftreten äquivalenter Mengen der α - β -ungesättigten Aminosäuren α -Aminoacrylsäure und α -Aminocrotonsäure. Die Reaktion verläuft nach dem in Abb. 4 dargestellten Mechanismus:

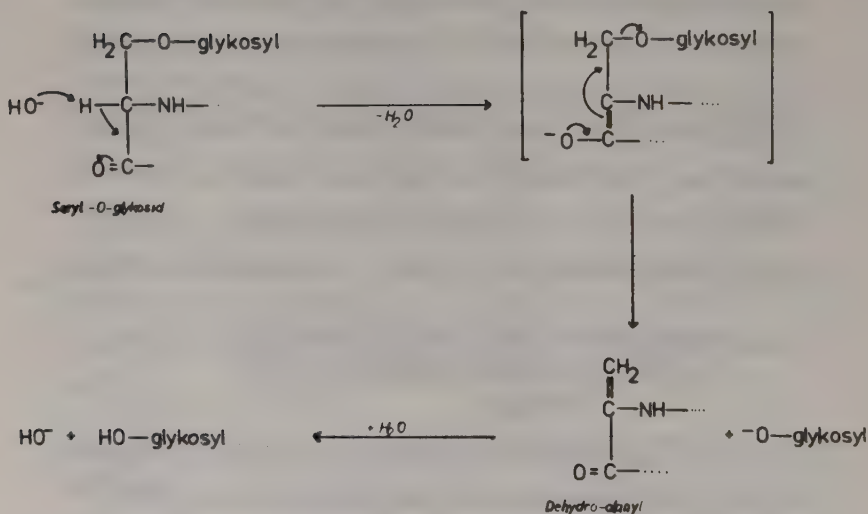


Abb. 4 : Mechanismus der β -Elimination

Sowohl die Veresterung der Carboxylgruppe als auch die Substitution an der Aminogruppe sind für das Ausmaß solcher β -Eliminationsreaktionen von erheblicher

Bedeutung (24). Die Eliminationsrate ist außerdem abhängig von der Stärke der verwendeten Lauge und dem Lösungsmittel.

Die N-substituierte α -Aminoacrylsäure zeigt bei 241 nm, das entsprechende Threoninderivat α -Aminocrotonsäure bei 231 nm ein Absorptionsmaximum. Durch Natriumborhydrid lassen sich die ungesättigten Aminosäuren hydrieren (25). Aus Serin bzw. α -Aminoacrylsäure entsteht durch L - Alanin, aus Threonin bzw.

α -Aminocrotonsäure entsteht α -Aminobuttersäure. Anhand der geschilderten Daten und Reaktionen läßt sich zur Aufklärung der Protein-Kohlenhydrat-Bindung folgende Untersuchungsstrategie aufstellen:

1. Man setzt das Glykoprotein oder -peptid alkalischen Bedingungen aus z.B. 0,1 N NaOH und mißt die Absorption bei einer Wellenlänge von 241 nm über einen längeren Zeitraum (ca. 6 h). Ein Anstieg der Absorption deutet auf eine O-glykosidische Bindung über die Aminosäuren Serin und Threonin hin.
2. Man führt eine Aminosäureanalyse vor und nach Behandlung des Glykoproteins bzw. -peptids mit 0,1 N NaOH durch, die gleichzeitig 0,3 molar an Natriumborhydrid ist. Größere Verluste von Serin und/oder Threonin nach Behandlung mit Alkali und das Auftreten entsprechender Mengen an L-Alanin und/oder α -Aminobuttersäure zeigen das Vorliegen einer O-glykosidischen Bindung an.

4.2. Untersuchungsmethode zum Nachweis der N - Acyl-glucosylaminbindung

Die N-Acyl-glucosylaminbindung ist sowohl gegen Säuren als auch gegen Laugen relativ stabil (vgl. Kap. 4). Ihre Beständigkeit gegenüber Säuren ist wesentlich höher als die der normalen glykosidischen Bindungen in Oligo- und Polysacchariden (8). Aufgrund dieses Befundes kann man durch partielle Säurehydrolyse des Kohlenhydrat-Peptidkomplexes u.U. Fragmente erhalten, die aus einem Monosaccharid und einer Aminosäure (Asparagin) bestehen. Diese Bruchstücke stellen die Bindungsorte zwischen Zuckerkette und Polypeptidkette dar.

Die Hydrolysen führte ich mit 1 oder 2 N Salz - oder Schwefelsäure bei 100° C über Zeiträume von 12 - 30 Minuten durch. Die Isolierung der Bruchstücke erfolgte chromatographisch oder elektrophoretisch.

4.3. Protein - Kohlenhydrat - Bindung der D-Oxynitrilase

Die Untersuchungen der Protein-Kohlenhydrat-Bindung im Molekül der D-Oxynitrilase wurden an dem Apoprotein des Isoenzymgemisches und den Apoproteinen der Isoenzyme I, II und III durchgeführt.

Ich habe jeweils 2 mg mit 4 ml 0,1 N NaOH versetzt und auf 20° C temperiert. Innerhalb eines Zeitraumes von 7 h bestimmte ich alle 30 min die Extinktion bei 241 nm. Als Vergleichsprobe diente eine Lösung von 2 mg Galaktose in 4 ml 0,1 N NaOH. Bei allen vier Apoproteinen konnte eine Extinktionszunahme registriert werden.

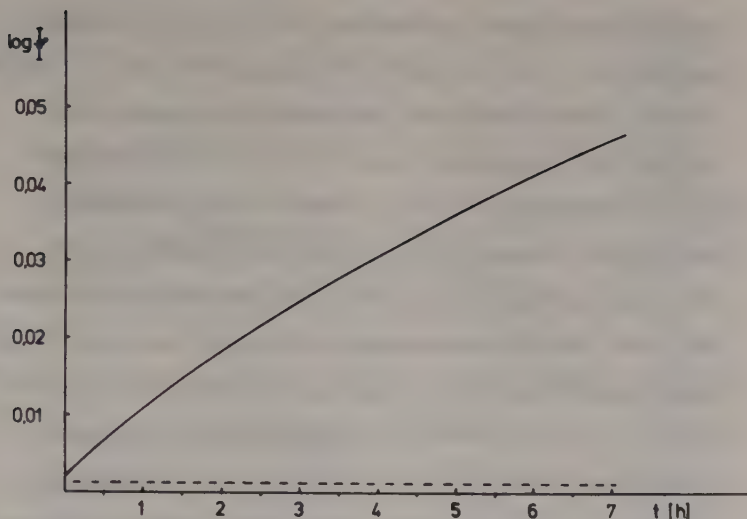


Abb. 5: Extinktionszunahme einer Lösung von 2 mg Apoprotein des Isozymgemisches in 4 ml 0,1 N NaOH bei 20°C. - - - - - = Galaktose-Lösung.

Meßgerät: Spektralphotometer PMQ II Zeiss

Auf die Darstellungen des zeitlichen Verlaufs der Extinktionszunahme bei den einzelnen Isoenzymen wurde verzichtet, da sie mit der obigen Abbildung identisch sind.

In einer zweiten Versuchsserie wurden jeweils 2 mg Apoprotein des Isozymgemisches in 4 ml 0,1 N NaOH gelöst, die 0,3 molar an Natriumborhydrid ist, und 10h auf 45°C temperiert. Danach erfolgte Neutralisation der Reaktionslösung mit 4 N Essigsäure. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurde mit konstant siedender HCl (ca. 5,7 N) aufgenommen, in ein Hydrolyseröhrchen überführt, unter Stickstoff eingeschmolzen und 24h hydrolysiert.

Anschließend wurde getrocknet und für die Aminosäureanalyse mit 1 ml Probenverdünnungspuffer pH 2,2 aufgenommen. Hydrolysate von unbehandeltem Apoprotein dienten als Standardproben. Für die Aminosäureanalysen verwendete ich den automatischen Aminosäureanalysator Beckmann Multichrom 4255-Flüssigkeits-säulenchromatograph mit Ein- und Zweisäulenverfahren. Nach dem bereits vorliegenden Resultat war mit einer Veränderung des Serin- und/oder Threoningehaltes zu rechnen. Im letzteren Falle mußte das Elutionsprofil einen zusätzlichen Peak aufweisen, da Threonin nach β -Elimination und folgender Hydrierung durch Natriumborhydrid in α -Aminobuttersäure überführt wird, die nicht in natürlichen Peptiden vorkommt. Die Retentionszeit⁺ dieser neuen Aminosäure muß sich jedoch von den Retentionszeiten anderer Aminosäuren genug unterscheiden, damit keine Überlappung der Peaks eintritt.

Die Elution der einzelnen Aminosäuren mit Pufferlösungen steigenden pH-Wertes von sulfonierten Austauschharzen erfolgt in der Reihenfolge: Cysteinsäure, Methioninsulfoxid, Hydroxyprolin, Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Glycin, Alanin

⁺ Unter der Retentionszeit wird hier der Zeitraum verstanden, der vom Auftreten des Ninhydrinpeaks bis zum Maximum des Peaks der jeweils betrachteten Aminosäure verstreicht.

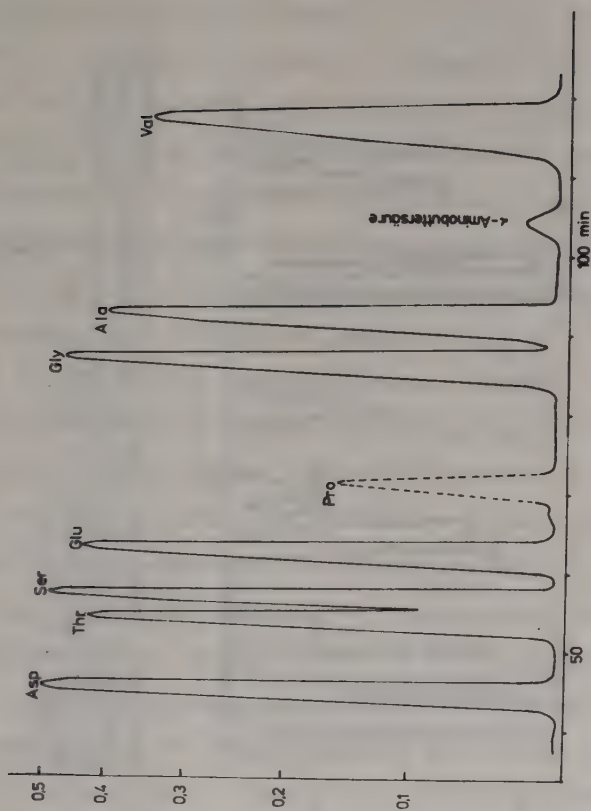


Abb. 6: Ausschnitt aus dem Elutionsprofil einer säulenchromatographischen Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren nach Behandlung des Apoproteins (Isoenzymgemisch) mit Alkali in Gegenwart von NaBH_4 und anschließender saurer Hydrolyse. Messung in 16 mm Küvette bei 570 nm (Pro bei 440 nm)

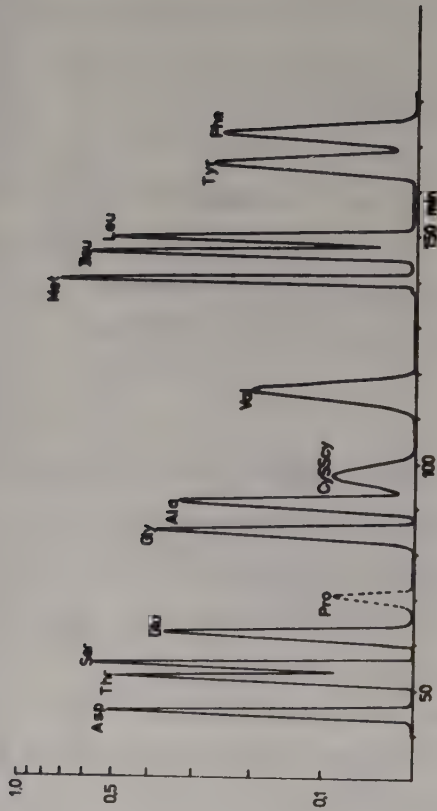


Abb. 7: Zeitliche Folge der sauren und neutralen Aminosäuren
Messung in 3 mm Kuvette bei 570 nm (Pro bei 440 nm).
Die Peakflächeninhalte entsprechen einer jeweiligen
Aminosäurekonzentration von 0,3 Mol
(CySScy = 0,15 Mol)

Cystin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Hydroxylysin, Lysin, Histidin und Arginin. Aminosäuren mit unsubstituierten Seitenketten werden in der Reihenfolge ihrer Anzahl von C-Atomen eluiert, z.B. Glycin (2 C-Atome), Alanin (3 C-Atome), Valin (5 C-Atome) usw. Bei Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten werden jene mit höherem Verzweigungsgrad früher eluiert, z.B. Isoleucin vor Leucin oder Norleucin vor Leucin.

Hydroxyaminosäuren haben ebenfalls kürzere Retentionszeiten als die entsprechenden nicht hydroxylierten Derivate, z.B. Serin vor Alanin (beides C-3 Verb.) und Threonin vor α -Aminobuttersäure (beides C-4 Verb.). Für die Lage des α -Aminobuttersäurepeaks im Elutionsprofil war nach diesen Daten eine Position zwischen den Peaks von Cystin und Valin zu erwarten. Die qualitative Auswertung der Elutionsprofile ergab für die mit 0,1 N NaOH behandelten Apoproteine einen neuen Peak vor Valin. Cystin fehlte im Hydrolysat, da diese Aminosäure unter den angewendeten Hydrolysebedingungen bevorzugt mit den Abbauprodukten der Zucker reagiert. (8) (s. Abb. 6)

In Abb. 7 sind die Retentionszeiten der sauren und neutralen Aminosäuren unter Anwendung der Zweisäulenmethode dargestellt.

Die qualitativen Aminosäureanalysen zeigten zunächst keine Veränderung des Seringehaltes, das wie bereits mehrfach erwähnt, über eine β -Eliminationsreaktion und anschließender Hydrierung die Aminosäure Alanin liefern sollte.

Die genauere Untersuchung der quantitativen Analyse zeigt dagegen einen Serinverlust, dem eine äquivalente Erhöhung des Alaningehaltes entspricht. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse von sechs quantitativen Analysen zusammengestellt:

Tab. 4 : Zusammenstellung der Ergebnisse von 6 quantitativen Aminosäureanalysen nach Behandlung des Apoproteins (Isoenzymgemisch) mit Alkali in Gegenwart NaBH_4

<u>Analyse 1 :</u>	Standard n Mol	Apoprotein +NaOH+NaBH ₄ nMol	Änderung in nMol
Threonin	38	31	-7
Serin	54	42	-12
Alanin	33	41	+11
α-Aminobut.	--	7	+ 7
<u>Analyse 2:</u>			
Threonin	64	52	-12
Serin	82	65	-17
Alanin	60	75	+15
α-Aminobut.	--	10	+10
<u>Analyse 3:</u>			
Threonin	109	87	-22
Serin	144	114	-30
Alanin	103	129	+26
α-Aminobut.	---	20	+20
<u>Analyse 4:</u>			
Threonin	183	145	-38
Serin	249	196	-53
Alanin	176	221	+45
α-Aminobut.	--	34	+34

Analyse 5:

Threonin	35	28	-7
Serin	49	38	-11
Alanin	30	39	+ 9
α -Aminobut.	--	6	+ 6

Analyse 6:

Threonin	47	37	-10
Serin	67	52	-15
Alanin	41	53	+12
α -Aminobut.	--	8	+ 8

Im Durchschnitt betragen die Änderungen des Threonin- bzw. Seringehaltes nach 24 stündiger Einwirkung von 0,1 N NaOH bei 45° C 20 bzw. 22 %.

Diesem Rückgang steht eine Erhöhung des α -Aminobuttersäure- bzw. Alaingehaltes von 17,5 bzw. 18,5% gegenüber.

Die Verluste von 2,5 - 3,5 % sind wahrscheinlich auf die Zerstörung von Threonin und Serin während der sauren Hydrolyse zurückzuführen. Eine Verlängerung der Einwirkungszeit von Natronlauge um 24 und 48 h bei 45° C brachte keine Erhöhung des Serin- und Threoninverlustes.

Führt man die Reaktion bei 20° C durch, dann ist eine Reaktionszeit von 120 h erforderlich, ohne daß die Ergebnisse wesentlich verändert werden. An einer N-Acylglucosylaminbindung in Glykoproteinen ist als Zuckerkomponente N-Acetyl-Glucosamin beteiligt (vgl. Kap. 1).

Obwohl bei der Analyse der Kohlenhydratbestandteile keine Hexosamine nachgewiesen werden konnten (vgl. Kap. 3.2.2.) habe ich die einzelnen Isoenzyme auf den Gehalt an

diesem Bindungstyp untersucht.

Die mit 1 N HCl über einen Zeitraum von 12 - 30 min bei 100 ° C durchgeführten Hydrolysen gaben keinen Anhaltspunkt für das Vorliegen einer N-Acyl-glucosylaminbindung. Die zuckerhaltigen Fragmente wanderten während der Hochspannungselektrophorese nicht. Ihre Analyse ergab, daß sie lediglich aus Zuckeranteilen bestanden. Aminosäuren waren nicht nachweisbar.

Werden diese Hydrolysen mit Apoprotein durchgeführt, das zuvor mit Alkali behandelt wurde, so sind überhaupt keine Zucker mehr in den Hydrolysen enthalten.

Aufgrund dieser Befunde kann eine N-Acyl-glucosylaminbindung mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Alkalische Kurzzeithydrolysen mit gesättigter Ba(OH)_2 -Lösung durchgeführt, zeigten ein überraschendes Ergebnis. Man erhält aminosäurehaltige Fragmente, die nach zweidimensionaler dünnschichtchromatographischer Trennung (Fließmittel: 1. Dimension: Chloroform/Methanol/17%iges NH_3 2:2:2 v/v; 2. Dimension: Phenol/ H_2O 75:25 g/g) (26) auf Kieselgelplatten an den Startpunkten liegen bleiben. Die Sichtbarmachung der Flecken erfolgte mit Anilinphthalat, nachdem die Platten zur Hydrolyse für 10 min in einen Chromatographietrog gestellt wurden, auf dessen Boden sich ein mit konz. HCl gefülltes Becherglas befand. Man kratzt von noch nicht entwickelten Platten die entsprechenden Flecken ab, eluiert und überführt das eingeeengte Eluat in eine Glasampulle. Nach Zugabe von 1 N HCl und intensiver Stickstoff-

spülung unter gleichzeitigem Einfrieren in flüssiger Luft wird zugeschmolzen und 18 h bei 100°C im Trockenschrank aufbewahrt. Nach Beendigung der Hydrolyse trennt man durch Zentrifugieren die unlöslichen Bestandteile ab und dampft das Zentrifugat bis zur Trockne ein. Für die Analyse des Aglykons wurde die Dansylierungsmethode nach W.R. GRAY und B.S. HARTLEY (27) gewählt, da die üblichen Entwickler für Aminosäuren bei den vorliegenden Aminosäurekonzentrationen versagten. Die Dansyl-Aminosäuren lassen sich durch zweidimensionale Chromatographie an Polyamidschichten trennen (Fließmittel: 1. Dimension: $\text{H}_2\text{O}/98^\circ/\text{oige Ameisensäure}$ 100:1,5 v/v; 2. Dimension: Benzol/Eisessig 9:1 v/v), und im UV-Licht aufgrund der kräftig grüngelben Fluoreszenz leicht lokalisieren. Die Erfassungsgrenze dieser Methode liegt im pico-Mol-Bereich.

Für das Mikrochromatogramm habe ich die Dansylierung nach den Angaben von V. NEUHOFF (28) unter Verwendung dansylierter Vergleichsproben von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin, Asparagin und Glutamin durchgeführt.

Bei der Auswertung der Chromatogramme traten zwei schwach ausgeprägte Flecken auf, die zwar aufgrund ihrer R_f -Werte in der 2. Dimension als Serin und Threonin angesprochen werden konnten, ihre R_f -Werte in der 1. Dimension waren jedoch zunächst kleiner als die der reinen Komponenten.

Zur genaueren experimentellen Überprüfung wurde dansy-

liertes Hydrolysat unter Zusatz einer kleinen Menge Vergleichsprobe aufgetragen und das Ergebnis der Trennung mit der reinen Standardprobe verglichen. Hierbei zeigte sich, daß die R_f -Werte in der 1. Dimension durch im Hydrolysat anwesende Fremdsbstanzen (Zucker, anorg. Plattenmaterial) verringert wurden. Damit war gesichert, daß beide Flecken den Aminosäuren Serin und Threonin zugeordnet werden konnten (vgl. Abb. 8 u. 9). Der große Nachteil dieses Verfahrens liegt allerdings darin, daß das Ergebnis nicht in allen Fällen reproduzierbar ist.

5. Untersuchung der Kohlenhydratketten

Nach den bisherigen Kenntnissen bestehen die Zuckeranteile in Glykoproteinen entweder aus einer oder mehreren Ketten, die aus einer relativ kleinen Anzahl Monosacchariden (ca. 1 bis zu 20) aufgebaut sind. In den meisten Fällen scheinen diese Oligo- bzw. Polysaccharideinheiten verzweigt zu sein (8).

Zur Charakterisierung der Monosaccharide steht heute eine ganze Skala von Methoden zur Verfügung. Sie reicht von chromatographischen Verfahren (Säulenchromatographie, Gaschromatographie usw.) über spektroskopische Methoden (CD, ORCD, Massenspektroskopie, NMR-Spektroskopie usw.) bis zu hochspezifischen enzymatischen Untersuchungsmethoden.

Natürlich läßt sich nicht jede Methode für jedes Problem anwenden, da in vielen Fällen die zur Verfügung stehenden Substanzmengen die Untersuchungsmöglichkeiten stark einschränken.

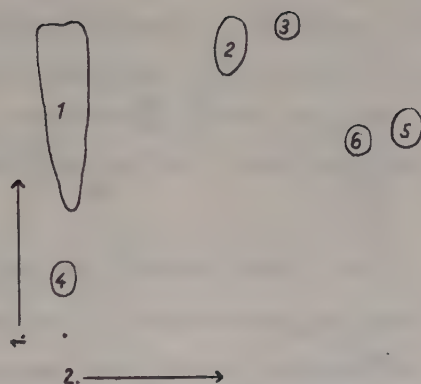


Abb. 8: Trennung des dansylierten zuckerhaltigen Aminosäuregemisches nach Zugabe einer geringen Menge reinen Dansyl-Serins

1. Dansyl-OH 2. Serin 3. Threonin 4. nicht identifizierbar 5. Dansyl-NH₂ 6. Glycin

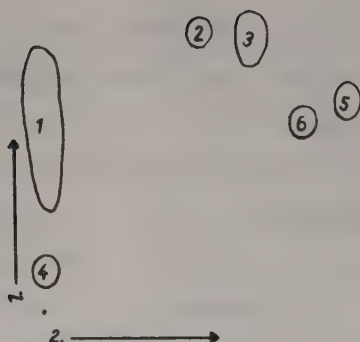


Abb. 9: Trennung des dansylierten zuckerhaltigen Aminosäuregemisches nach Zugabe einer geringen Menge reinen Dansyl-Threonins

1. Dansyl-OH 2. Serin 3. Threonin 4. nicht identifizierbar 5. Dansyl-NH₂ 6. Glycin

Voraussetzung für strukturelle Untersuchungen an Oligo- oder Polysaccharidketten in Glykoproteinen sind Kenntnisse über die qualitative Zusammensetzung und über die Bindungstypen der Kohlenhydrat-Protein-Bindung. So gelingt die Abtrennung und Isolierung der Zuckerketten z.B. durch Behandlung der Glykoproteine oder -peptide mit Alkali (vgl. Kap. 4.1.).

Um enzymatische Untersuchungen durchzuführen, ist es notwendig, das Protein in kleine Einheiten zu zerlegen und die zuckerhaltigen Fragmente abzutrennen. Diese Zerlegung gelingt besonders schonend durch Verwendung geeigneter Proteinasen. Im Extremfall lassen sich nach dieser Methode Zuckerketten mit nur einer einzigen Aminosäure isolieren.

5.1. Darstellung von Glykopeptiden

Zur Darstellung der Glykopeptide eignen sich besonders solche Proteinasen, die relativ unspezifisch spalten. Die Proteinase mit der breitesten Spezifität ist das Enzym Pronase E aus *Streptomyces griseus* (29). Es hydrolysiert praktisch alle Peptidbindungen in Proteinen und Peptiden bis zu den freien Aminosäuren. Dadurch ist gewährleistet, daß Glykopeptide mit relativ kleinem Aglykon-Anteil erhalten werden können.

Für die vorliegenden Untersuchungen habe ich jeweils 100 mg hitzedenaturiertes Apoprotein des Isoenzymgemisches mit 1 mg Pronase E in 4 ml 0,07 M Phosphatpuffer pH 7,4 120 h bei 37°C hydrolysiert. Die Proteinase wurde durch Hitzedenaturierung inaktiviert und ausgefällt. Nach Abtrennung des Proteinnieder-

schlages engte ich den Überstand auf ca. 0,1 ml. ein.

5.1.1. Isolierung und Trennung der Glykopeptide

Präparative Trennversuche mit dem automatischen Aminosäureanalysator unter Verwendung einer mit sulfoniertem Polystyrol-Austauscherharz (M 81) gefüllten und mit Pyridin-Acetat-Puffer äquilibrierten 1,50 m langen Säule erwiesen sich als ungeeignet. Die Glykopeptide wurden nicht in bestimmten Fraktionen, sondern stark auseinandergezogen eluiert.

Eine befriedigende Auftrennung des Aminosäure-Peptidgemisches gelang schließlich an 1,30 m langen Sephadex G 25 Säulen ($\varnothing$ 1 cm). Eine 0,1 M Essigsäurelösung war das Elutionsmittel. Die Fraktionsfolge betrug 60 min bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 2,5 ml pro h. Den einzelnen Fraktionen wurden jeweils 0,2 ml entnommen und nach der Methode von M. DUBOIS (20) auf ihren Zuckergehalt überprüft.

Wie aus dem Elutionsprofil hervorgeht (vgl. Abb. 10), sind die glykopeptidhaltigen Fraktionen nach ca. 22 h von der Säule abgelöst. Fraktion 22 enthält das erste und Fraktion 52 das letzte ninhydrinpositive Material. Die Elution des letzten zuckerhaltigen Materials erfolgte nach 25 h. In den Glykopeptidfraktionen sind 90% des Zuckeranteiles der eingesetzten Proteinmenge enthalten.

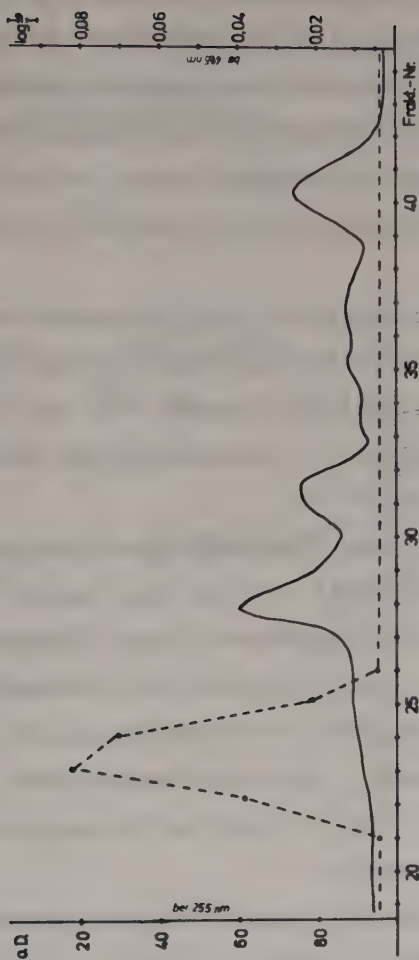


Abb. 10 : Elutionsprofil eines Pronase-Hydrolysates des Isoenzymgemisches
 ---- Extinktion bei 480 nm nach Prüfung der Fraktion auf
 ihren Zuckergehalt unter Anwendung der Methode von DUBOIS (20)

Die weitere Auftrennung des Glykopeptidgemisches wurde elektrophoretisch bei 1000 V Spannung unter Verwendung eines Pyridin-Acetat-Puffers pH 6,5 durchgeführt. Versuche mit Pyridin-Acetat-Puffer pH 3,5 und pH 4,6 zeigten keine besseren Ergebnisse. In Abb. 11 ist das Peptidmuster der Glykopeptidfraktion dargestellt. Insgesamt konnte ich nach Entwicklung der Platte mit Ninhydrinreagenz 23 Flecken registrieren.

Nach 10 minütiger Einwirkung von HCl-Dämpfen auf noch unentwickelte Platten und anschließender Entwicklung mit Anilinphthalat-Reagenz sind im UV-Licht 4 Flecken zu erkennen. Sie entsprechen den Peptiden 1,12,13 und 23 in Abb. 11.

Bei 10 Versuchen unter standardisierten Bedingungen konnte das Trennergebnis sehr gut reproduziert werden. Zur Überprüfung der Homogenität dieser Glykopeptide sind sie von den Platten isoliert und rechromatographiert worden. Abb. 12 zeigt das rechromatographierte Peptidgemisch. Glykopeptid 1 ist leicht anodenwärts, die Glykopeptide 2 und 3 leicht und Glykopeptid 4 stark kathodenwärts verschoben.

Während die ersten drei Peptide bei der chromatographischen Trennung praktisch unbeweglich sind, wandert Glykopeptid 4 gut im verwendeten Fließmittel (Pyridin/n-Butanol/Eisessig/H₂O 100:170:35:62 v/v).

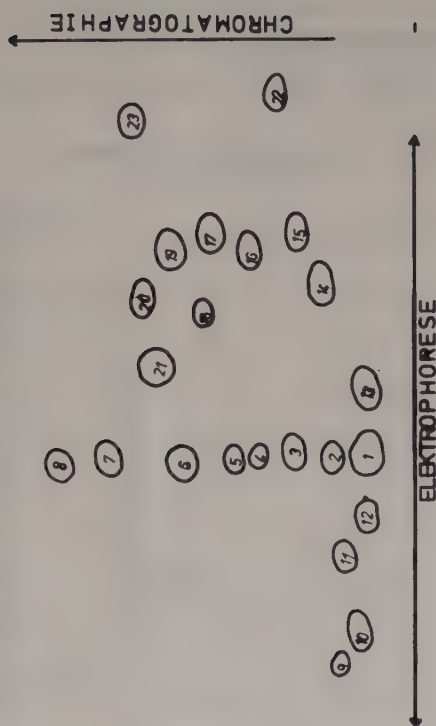


Abb. 11: Peptidmuster der vereinigten Glykopeptidfraktionen (Auftrennung auf Dünnschichtplatten (Kieselgel G 1500) Elektrophoretisch bei pH 6,5 (horizontal), chromatographisch (vertikal) in Pyridin-Eisessig-n-Butanol-Wasser (100:35:170:62))

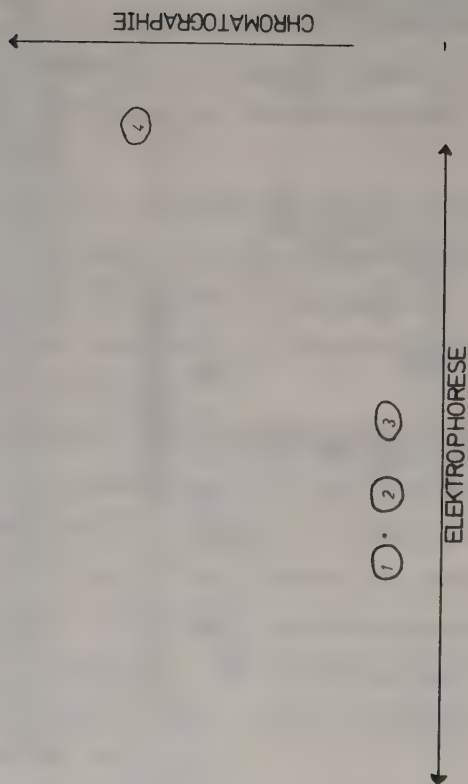


Abb. 12: Rechromatographie der Glykopeptide

5.1.2. Ergebnisse der Aminosäureanalysen

Zur Durchführung einer Aminosäureanalyse habe ich die Glykopeptidflecken von jeweils fünf Platten isoliert und mit 5,7 N HCl 24 h bei 100° C hydrolysiert. Die Vorbereitung und Durchführung der Analysen erfolgte nach dem üblichen Verfahren (vgl. Kap. 4.3.).

Die Analysen zeigten folgende Ergebnisse:

Tab. 5: Aminosäurezusammensetzung der reinen Glykopeptide

Glykopeptid 1:	nMol	Mol-%	Mol Verhältnis
Asparaginsäure	2,6	16,9	4
Threonin	1,6	10,4	2
Serin	3,3	21,4	5
Glutaminsäure	2,1	13,6	3
Glycin	2,8	18,2	4
Alanin	1,5	99,7	2
Leucin	0,8	5,2	1
Histidin	0,7	4,6	1
Glykopeptid 2:	nMol	Mol-%	Mol Verhältnis
Asparaginsäure	6,0	14,9	5
Threonin	4,7	11,7	4
Serin	7,3	18,2	6
Glutaminsäure	4,1	10,2	3
Prolin	3,5	8,7	3
Glycin	4,0	10,0	3
Alanin	2,9	7,2	2
Valin	1,2	3,0	1
Leucin	2,1	5,2	2
Lysin	4,4	10,9	4

Glykopeptid 3:

	nMol	Mol-%	Mol Verhältnis
Asparaginsäure	2,3	16,9	2
Threonin	1,1	8,1	1
Serin	3,5	25,7	3
Glutaminsäure	2,3	16,9	2
Glycin	2,8	20,6	3
Alanin	1,6	11,8	2

Glykopeptid 4:

	nMol	Mol-%	Mol Verhältnis
Asparaginsäure	1,0	10,9	1
Threonin	1,1	12,0	1
Serin	2,2	23,9	2
Glutaminsäure	1,8	19,6	2
Glycin	2,1	22,8	2
Alanin	1,0	10,9	1

Eine graphische Darstellung der Aminosäurezusammensetzung der Glykopeptide zeigen Abb. 13 und 14. Der Gehalt an α -Aminodicarbonsäuren in den Peptiden ist z.T. recht beträchtlich. Aus dem hohen Ammoniakgehalt der Hydrolysate und dem Verhalten der Peptide in der Hochspannungselektrophorese folgt, daß wahrscheinlich ein wesentlicher Teil der α -Aminodicarbonsäuren als Säureamide (Asparagin, Glutamin) vorliegt.

Auch die Ergebnisse dieser Aminosäureanalysen schließen das Vorliegen einer N-Acyl-glucosylaminbindung aus, da keine Aminozyuckerpeaks beobachtet wurden.

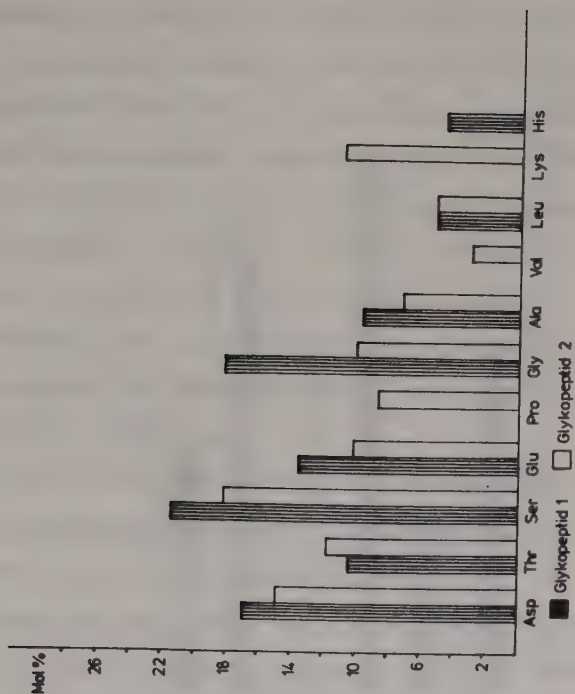


Abb. 13: Aminosäurezusammensetzung der Glykopeptide 1 und 2

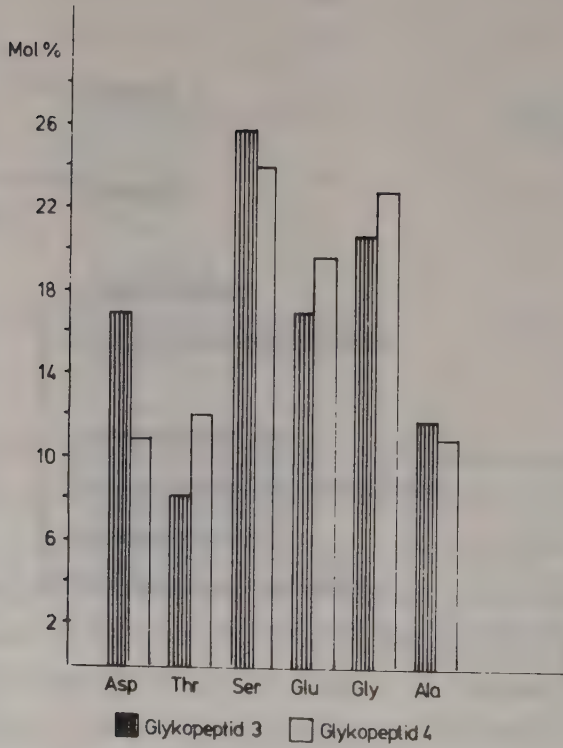


Abb. 14: Aminosäurezusammensetzung der Glykopeptide 3 und 4

5.2. Untersuchung der Zuckerketten nach Behandlung der Glykopeptide mit Alkali

Durch Einwirkung von 0,1 N NaOH auf die Glykopeptidfraktion des Isoenzymgemisches in Gegenwart von Natriumborhydrid lassen sich die Zuckerketten von den Peptiden abtrennen (vgl. Kap. 4.1.). Natriumborhydrid reduziert dabei nicht nur die durch β -Elimination entstandenen ungesättigten Aminosäuren im Peptid, sondern auch die freigesetzten Zuckerketten. Der an der Kohlenhydrat-Protein-Bindung beteiligte Zucker wird dadurch in den entsprechenden Zuckeralkohol überführt. Isoliert man die Oligosaccharidketten und hydrolysiert sie, dann läßt sich nach Identifizierung des Zuckeralkohols das ihm entsprechende an der Kohlenhydrat-Protein-Bindung beteiligte Monosaccharid bestimmen.

Schwierigkeiten kann allerdings die chromatographische Trennung von Monosacchariden und den entsprechenden Zuckeralkoholen bereiten.

Im vorliegenden Falle habe ich die Glykopeptide 24 h bei 45° C mit 0,1 N NaOH (0,3 molar an NaBH_4) behandelt, danach mit 4 N Essigsäure neutralisiert und auf dem Rotavapor bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 1 ml 0,01 N HCl aufgenommen und zur Abtrennung der Peptide und Aminosäuren über den stark sauren Kationenaustauscher Dowex 50 X 2 (200-400 mesh; H^+ -Form) gegeben. Die im Eluat befindlichen Zuckerketten habe ich anschließend mit 1 N HCl 3 h bei 100° C hydrolysiert.

Parallel zu diesem Versuch wurden nicht mit Alkali behandelte Glykopeptide unter gleichen Bedingungen hydrolysiert.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab, daß in dem mit NaOH behandelten Material lediglich Glucose nachweisbar war. Das unbehandelte Material enthielt Glucose und Galaktose.

Entwickelt wurden die Chromatogramme mit Anilinthalal- und Anisaldehyd-Reagenz. Dabei wurden allerdings nur die reduzierenden Zucker erfaßt. Führt man die Entwicklung mit Silbernitrat-NaOH durch, das auf Zucker und Polyalkohole anspricht, erhält man auch im ersten Falle zwei Flecken.

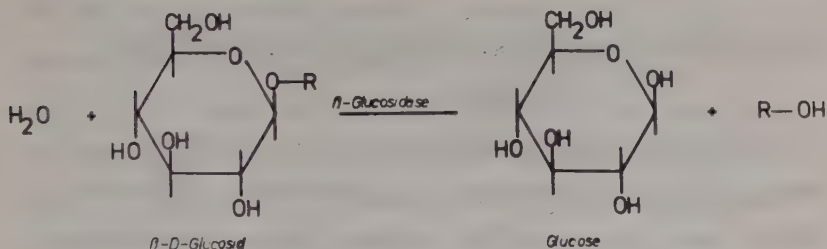
Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Zuckerketten über Galaktose an die Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin gebunden sind. Der übrige Rest der Ketten besteht folglich nur aus Glucose-Einheiten.

5.3. Die enzymatische Hydrolyse: eine Methode zur Strukturaufklärung von Oligo- bzw. Polysacchariden

Die Darstellung hochgereinigter Enzympräparate ermöglicht strukturelle Untersuchungen mit Hilfe bestimmter spezifischer Enzyme. Diese Methode hat nicht nur den Vorzug, oft schwierige präparative Trennungen und Umsetzungen zu umgehen, sondern auch mit kleinen und kleinsten Substratmengen durchführbar zu sein.

Für die Untersuchung von Zuckerketten eignen sich kohlenhydratspaltende Enzyme, Glykosidasen, eine Untergruppe der Hydrolasen. Diese spalten je nach ihrer Substratspezifität die glykosidischen Bindungen in Oligo- und Polysacchariden, sowie von N- und S-glykosidischen Bindungen. Glykosidasen verfügen darüber hinaus über eine stereochemische Spezifität, d.h. sie spalten entweder nur α - oder β -glykosidische Bindungen.

Die Hydrolyse verläuft nach folgendem Schema (dargestellt am Beispiel der β -Glucosidase):



Das Gleichgewicht liegt weit auf seiten der Spaltung. Die meisten Glykosidasen sind eigentlich Transglykosidasen, die den glykosidisch gebundenen Zuckerrest auf andere geeignete Moleküle mit OH-Gruppen übertragen. Natürlich liegt als entsprechendes Molekül stets Wasser in besonders hoher Konzentration vor. Die Übertragung auf Wasser ist gleichbedeutend mit einer Hydrolyse (30).

Neben einer strengen Substrat- und Stereospezifität unterscheiden sich einige Glykosidasen auch in ihrer Wirkungsweise beim Abbau des Substrates. Sie greifen die Zuckerketten entweder von einem Ende her an, oder spalten Bindungen im Inneren. Dementsprechend werden sie als Exo- oder Endoenzyme bezeichnet. Aufgrund der aufgezeigten Eigenschaften der Glykosidasen lassen sich folglich durch ihre gezielte Einwirkung auf Oligo- oder Polysaccharidketten bekannter Zusammensetzung Einblicke in die Konfiguration der Bindungen (α - oder β - Konfiguration), Art der Bindung (1.4.- oder 1.6-) und Art der Zucker an den Kettenenden gewinnen.

5.4. Durchführung und Ergebnisse der enzymatischen Hydrolysen

Es wurden die Glykopeptidfraktionen des Isoenzymgemisches und des Isoenzym III untersucht. An dieser Stelle kann bereits erwähnt werden, daß die erhaltenen Ergebnisse in beiden Fällen identisch waren. Im folgenden wird daher auf eine Unterscheidung des Untersuchungsmaterials verzichtet.

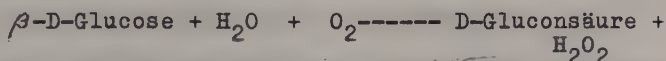
Die durchgeführten Experimente haben qualitativen Charakter. Auf quantitative Untersuchungen ist verzichtet worden, da zu diesem Zwecke relativ große Mengen gereinigten Glykopeptidmaterials erforderlich gewesen wäre.

Für die einzelnen Untersuchungen sind folgende Glykosidasen ausgewählt worden:

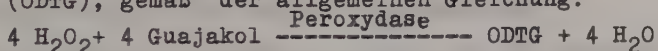
α -Amylase, β -Amylase, α -Glucosidase, β -Glucosidase
 α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase und β -Galaktosidase.

Zum Nachweis der Hydrolysenprodukte wurden die Systeme Glucoseoxydase - Peroxydase - Guajakol und Galaktose-Dehydrogenase - NAD^+ benutzt.

In dem ersten System wird Glucose durch Glucoseoxydase zu Gluconsäure unter Bildung von H_2O_2 oxydiert:



Das gebildete H_2O_2 dient der Peroxydase als Substrat. In zwei aufeinanderfolgenden 1-Elektronenschritten unter Dehydrierung des Guajakols wird das H_2O_2 durch die Peroxydase reduziert, unter Dehydrierung des Guajakols entsteht über radikalische Zwischenstufen u.a. eine farbige Verbindung, das Octadehydrotetragejakol (ODTG), gemäß der allgemeinen Gleichung:



Die OTDG-Bildung kann photometrisch bei 436 nm verfolgt werden. Das geschilderte System ist einfach zu handhaben und erwies sich als hinreichend empfindlich. Im zweiten System überträgt Galaktose-Dehydrogenase Wasserstoff von Galaktose auf NAD^+ , wobei dieses zu

NADH + H⁺ reduziert wird. Diese reduzierte Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 340 nm; ihre Bildung kann aufgrund der Absorptionzunahme bei dieser Wellenlänge verfolgt werden.

Nachfolgend werden die verwendeten Glykosidasen bezüglich ihrer Reaktionen mit den entsprechenden Substraten kurz beschrieben.

α -Amylase: Das Enzym spaltet 1.4- α -glucosidische Bindungen. Die Konfiguration am reduzierenden Ende der Spaltprodukte ist primär α -glykosidisch. α -Amylase ist ein Endoenzym.

β -Amylase: Jede zweite 1.4 α -glucosidische Bindung wird vom nichtreduzierenden Ende unter Freisetzung von Maltose-Einheiten hydrolysiert. Diese besitzen am reduzierenden Ende β -Konfiguration. Das Enzym ist also ein Exoenzym.

α -Glucosidase: Das Enzym spaltet α -1.4-glucosidische Bindungen in Maltose-Einheiten.

α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase: Das Enzym hydrolysiert α -1.4- und α -1.6-glucosidische Bindungen vom nichtreduzierenden Ende her unter Freisetzung von Glucose.

β -Glucosidase und β -Galaktosidase: Beide Enzyme spalten spezifisch eine ganze Reihe von β -D-Glucosiden bzw. β -D-Galaktosiden.

Die Experimente mit den beiden letzten Enzymen verliefen in allen Fällen negativ. Daraus kann geschlossen werden, daß innerhalb der Zuckerketten keine β -glucosidischen bzw. β -galaktosidischen Bindungen auftreten.

Läßt man die Exoglucosidase β -Amylase kombiniert mit α -Glucosidase in Gegenwart von Glucoseoxydase, Peroxydase und Guajakol auf die Glykopeptide über mehrere Stunden einwirken, dann erfolgt ein stetiger Anstieg der Absorption bei 436 nm. Das gleiche Ergebnis erhält man bei Verwendung von α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase, die ebenfalls die Zuckerketten vom nichtreduzierenden Ende her hydrolysiert (vgl. Abb. 15). Daraus ergibt sich, daß neben dem Vorliegen α -1.4-glucosidischer Bindungen die nichtreduzierenden Kettenenden aus Glucose-Einheiten bestehen.

Zum Nachweis von α -1.6-glucosidischen Bindungen und eventuell damit zusammenhängenden Verzweigungen der Ketten sind äquimolare Mengen Glykopeptidmaterial über 24 und 48 h mit α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase bzw. α -Amylase in Kombination mit α -Glucosidase hydrolysiert worden. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten keine signifikanten Abweichungen im Glucose-Gehalt wie es bei hohem Verzweigungsgrad über die

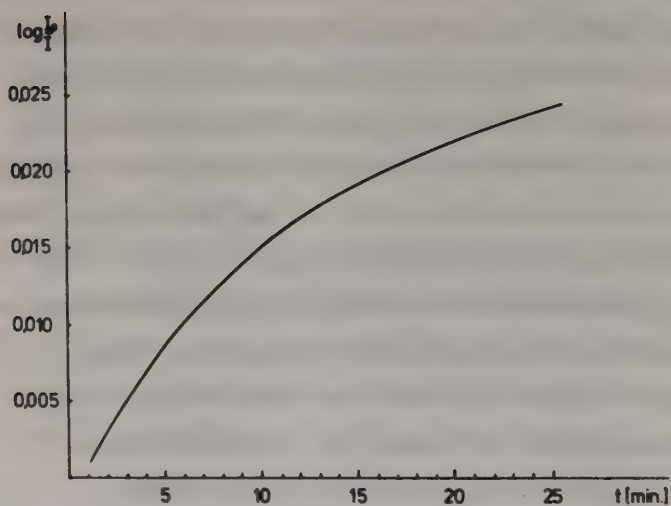


Abb. 15: Extinktionsanstieg bei Einwirkung von ~~1.4~~1.6-Amyloglucosidase auf die Glykopeptide (in Gegenwart von Glucose-Oxidase, Peroxidase und Guajakol)
Messung bei 436 nm
Spektralphotometer Beckmann Acta III

C6-Atome verschiedener Glucose-Moleküle innerhalb der Ketten zu erwarten gewesen wäre.

Auch ein höherer Verzweigungsgrad über die C2- und C3-Atome kann ausgeschlossen werden, da die Exoglucosidasen an den Verzweigungsstellen blockiert worden wären. Das hätte sich in einem signifikant geringeren Glucosegehalt bezüglich der mit Endoglucosidase behandelten Proben geäußert.

In den Hydrolysaten konnte niemals Galaktose unter Verwendung des Systems Galaktose-Dehydrogenase - NAD^+ nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, daß die enzymatische Spaltung nicht die Bindung zwischen Peptid- und Zuckerkette erfaßt.

5.5. Chromatographie der D-Oxynitrilase an Con A-Sepharose

Concanavalin A (Con A) ist ein aus *Canavalia ensiformis* isoliertes haemagglutinierendes Protein (Lectin). In gleicher Weise wie es mit Erythrocyten agglutiniert, bildet es mit zahlreichen Polysacchariden und Glykoproteinen unlösliche Komplexe. J.GOLDSTEIN et al. (31) untersuchte die Bedingungen, die zur Agglutination von Con A mit Polysacchariden und Glykoproteinen führen. Danach ist der entständige Zucker am nichtreduzierenden Ende der Zuckerketten sowie die Konfiguration der Bindung für die Affinität zu Con A von entscheidender Bedeutung.

Die Reaktion ist spezifisch für α -D-glucosyl- und sterisch verwandte Reste. α -D-Mannosyl- und α -D-Glucosylpyranoside besitzen hohe, α -Galaktosyl- und β -Glucosylpyranoside keine Affinität zu diesem Lectin (32). Chromatographiert man das Holoenzym der D-Oxynitrilase an Con A-Sepharose (Con A gebunden an Sepharose), tritt Agglutination ein. Nach Zugabe von 2%iger Methyl- α -D-Glucopyranosidlösung kann der Con A-Oxynitrilase-Komplex wieder dissoziieren, d.h. das Enzym ist eluierbar.

Das Ergebnis dieses Versuches beinhaltet zwei wesentliche Erkenntnisse:

1. Die Zuckerketten der einzelnen Isoenzyme können nicht im Inneren des Moleküls liegen. Sie müssen über die Oberfläche hinausragen, um mit dem reaktiven Zentrum des Lectins in Wechselwirkung treten zu können.
2. Die nichtreduzierenden Enden der Zuckerketten müssen mit einer Glucose-Einheit besetzt sein, die über eine α -glykosidische Bindung mit dem Kettenrest verknüpft ist (Außer Glucose liegt nur Galaktose vor).

6. Diskussion

Die Untersuchung der Kohlenhydratkomponenten im Oxynitrilasemolekül hat gezeigt, daß dieses Protein ein Glykoprotein ist. Die Zuckerketten sind mit ihrem reduzierenden Ende über die Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin mit der Polypeptidkette verknüpft. Ein Vergleich der in der letzten zehn Jahren gewonnenen Ergebnisse der Glykoproteinforschung weist auf ein grundlegendes Strukturmerkmal dieser Verbindungsklasse : die Kohlenhydratkomponenten sind kovalent mit dem Protein verbunden. Die reduzierenden Enden der Zuckerketten bilden die Verknüpfungsstellen. Sie bestehen entweder aus einem N-Acetyl-Galaktosamin, einer Pentose oder einer Aldohehexose. Die Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin, Hydroxylysin und Hydroxyprolin bilden die Verknüpfungsstellen innerhalb der Polypeptidkette.

Die Zuckerketten der D-Oxynitrilase-Isoenzyme scheinen, wie aus ihrem chromatographischen Verhalten hervorgeht, einheitlich zu sein. Sie tragen an ihrem nichtreduzierenden Ende ein Glucose-, an dem reduzierenden Ende eine Galaktose-Einheit. Glucose und Galaktose stehen im Verhältnis 2 : 1.

Aufgrund der vollständigen Umsetzung von Galaktose zu Galaktit (Dulcit) bei der Reduktion der abgespaltenen Zuckerketten mit NaBH_4 in alkalischer Lösung scheint diese Hexose auf die reduzierenden Kettenenden beschränkt zu sein.

Dieser Befund und das Mengenverhältnis beider Zucker zueinander deuten auf einen dreigliedrigen Aufbau der Ketten hin. Sie stellen folglich α -D-Glucosido-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucosido (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galaktopyranoside dar. Verzweigungen scheinen nicht vorzuliegen.

Bei qualitativen Untersuchungen der Zuckerkomponenten in den Apoproteinen der Oxynitrilasen aus *Prunus persica*, *Malus communis* (33) und *Prunus laurocerasus* (34) ist lediglich Glucose gefunden worden. Affinitätschromatographische Trennungen an Con A-Sepharose haben gezeigt, daß auch in diesen Fällen Glucose-Einheiten die nichtreduzierenden Kettenenden besetzen und α -glykosidisch gebunden sind. Da Galaktose in geringeren Mengen als Glucose vorkommt (jedenfalls bei der D-Oxynitrilase aus *Pr. amygdalus*) und bei den oben erwähnten Untersuchungen noch nicht die optimalen Hydrolysebedingungen ermittelt wurden, kann die Galaktosekonzentration durch partielle Zerstörung dieses Zuckers unter der Nachweisgrenze der verwendeten Entwickler geblieben sein.

Das Emulsin von *Pr. amygdalus* enthält neben der D-Oxynitrilase β -Glucosidase, β -Galaktosidase, Mannosidase und N-Acetyl- β -hexosaminidase (35).

Die Emulsine der übrigen Arten sind noch nicht untersucht, doch darf man eine ähnliche Zusammensetzung vermuten.

Die Konfiguration der glykosidischen Bindungen innerhalb der Zuckerketten sowie das Fehlen von Hexosaminen bzw. N-Acetyl-Hexosaminen scheinen eine Art Schutzeinrichtung gegenüber dem enzymatischen Angriff der anderen im Emulsinkomplex enthaltenen Glykosidasen darzustellen.

Nach den bisherigen Befunden ist den Kohlenhydratanteilen der einzelnen D-Oxynitrilasen keine wesentliche Bedeutung bei der Ausprägung art- oder gattungsspezifischer Eigenschaften zuzuschreiben.

Die enzymatische Hydrolyse des Apoproteins der D-Oxynitrilase (Isoenzymgemisch) liefert vier Glykopeptide. Das gleiche Ergebnis erhält man bei der enzymatischen Hydrolyse des Apoproteins von Isoenzym III. Die Aminosäureanalysen der jeweiligen Peptide stimmten überein. Unter der Voraussetzung, daß dies auch bei den Isoenzymen I und II zutrifft, scheint aufgrund dieser Identität ein mehr oder weniger großer Bereich der Primärstruktur um die Kohlenhydrat-Protein-Bindungen in den drei Isoenzymen gleich zu sein. Das bedeutet, daß die Biosynthese dieser Bereiche bei allen Isoenzymen nach gleichem Modus ablaufen muß.

Die Biosynthese der Glykoproteine weicht im wesentlichen nicht von dem Normalweg ab. Den zentralen Schritt bei der Bildung der Zuckerketten stellt die Einführung des ersten Monosaccharids in das Protein dar.

Nach einer Theorie von V. GINSBURG (36) ist der regelmäßige Aufbau von Zuckerketten eines bestimmten Glykoproteins auf die Existenz spezifischer Glykosyltransferasen zurückzuführen. Arbeiten von S. ROSEMAN (37) und A. GOTTSCHALK (38) haben diese Theorie inzwischen experimentell untermauert.

Die Glykosyltransferase mit der größten Spezifität stellt jene dar, die das erste Monosaccharid auf eine entsprech ende Aminosäure im Polypeptid überträgt.

Dieses Enzym muß aus der Fülle der potentiellen Acceptorstellen immer die herausgreifen, die seiner Spezifität entsprechen. Das kann aber nur dann der Fall sein, wenn diese Spezifität auf eine bestimmte Aminosäuresequenz innerhalb der Polypeptidkette gerichtet ist.

Für die Biosynthese der Kohlenhydratketten innerhalb der Isoenzyme von Pr. amygdalus wären folglich vier verschiedene Glykosyltransferasen erforderlich, die in einem ersten Schritt Galaktose- Einheiten auf entsprechende Sequenzen in der Polypeptidkette übertragen und im engeren Sinne Galaktosyltransferasen darstellen. Exakte Beweise für die hier dargelegten Überlegungen werden natürlich erst genaue sequenzanalytische Untersuchungen der isolierten Glykopeptide liefern können.

Wie bereits erwähnt, sind die Kohlenhydratketten der einzelnen D-Oxynitrilasen für die Ausprägung art- oder gattungsspezifischer Eigenschaften offenbar bedeutungslos. Ob sie überhaupt spezifische Funktionen erfüllen, ist zur Zeit noch ungeklärt. Nach einer Theorie von E.H. EYLAR (39) soll der Zuckeranteil dem Proteinmolekül den Austritt durch die Zellmembran ermöglichen. Sie wird von P.J. WINTERBRUNN und C.F. PHELBS (40) abgelehnt, die in den Zuckerbestandteilen Rezeptoren bei Erkennungsprozessen für die Lokalisation der Glykoproteine innerhalb des Organismus sehen. Die Tatsache, daß die Zuckerkomponenten die Hydrophilie des Makromoleküls erhöhen, läßt eine Bedeutung der Kohlenhydratkomponenten für die Löslichkeit des Glykoproteinmoleküls vermuten. Es ist jedoch zweifelhaft, ob sich die Glykosylierung der D-Oxynitrilasen in dieser Aufgabe erschöpft.

7. Zusammenfassung

Die Apoproteine der Isoenzyme I, II, III, sowie das Apoprotein des Isoenzymgemisches enthalten 2,8%, 2,2%, 2,3% und 2,8% ($\pm 0,5\%$) Zuckeranteil. Dieser besteht aus den beiden Aldohexosen Glucose und Galaktose im Verhältnis 2 : 1. Der Kohlenhydratanteil ist kovalent an das Protein gebunden. Die Bindung erfolgt über die Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin einerseits und Galaktose andererseits.

Die Aldohexosen sind zu Ketten verknüpft und liegen 1.4.- α -glykosidisch gebunden vor. Die nichtreduzierenden Enden tragen Glucose-Einheiten, die reduzierenden Enden bestehen aus Galaktose-Einheiten. Verzweigungen der Ketten waren nicht nachweisbar.

Aufgrund der vorliegenden Daten scheinen die Ketten dreigliederig gebaut zu sein und stellen α -D-Glucosido-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucosido (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galaktopyranoside dar.

Die intensive enzymatische Hydrolyse der Apoproteine des Isoenzym III und des Isoenzymgemisches liefert jeweils vier Glykopeptide . Sie erweisen sich chromatographisch als einheitlich. Ihre quantitative Aminosäureanalyse wurde durchgeführt.

Experimenteller Teil

=====

1. Darstellung des Apoproteins der D-Oxynitrilase

1.1. Hitzedenaturierung

10 mg entsalzte D-Oxynitrilase denaturiert man in einem Zentrifugenglas im Trockenschrank bei Temperaturen zwischen 80° - 100° C. Das Apoprotein flockt innerhalb von 30 Minuten vollständig aus. Nach Abzentrifugieren des Proteinniederschlages erfolgt mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. bis keine Gelbfärbung und keine Fluoreszenz unter der UV-Lampe auftritt. In der Regel ist dies nach 5-6 maliger Wiederholung des Waschvorgangs erreicht.

1.2. Säuredenaturierung

10 mg der entsalzten D-Oxynitrilase werden im Zentrifugenglas bei Zimmertemperatur mit einigen Tropfen 1N HCl oder H_2SO_4 versetzt. Bereits nach wenigen Minuten beginnt die Ausflockung des Apoproteins. Nach ca. 30 Minuten ist eine vollständige Abtrennung der prosthetischen Gruppe erreicht. Nach Abzentrifugieren wird das Apoprotein durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. von PAD und Säureresten gereinigt.

2. Hydrolyse des Apoproteins zur Freisetzung der

Kohlenhydrate

2.1. Saure Hydrolysen

Für die Durchführung der sauren Hydrolysen wurden verschiedene Säurekonzentrationen Hydrolysezeiten und Temperaturbereiche verwendet, um die günstigsten Hydrolysebedingungen zu ermitteln.

In verschiedenen Testreihen hydrolysierte ich äquimolare Proteinmengen in 1N, 2N, 3N, 4N, 5N, 6N und 10N HCl über 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15 und 24 Stunden bei 80° und 100° C. Danach wurden die Hydrolysate nach der Methode von DUBOIS et al (20) quantitativ auf ihren Zuckergehalt überprüft. Aufgrund dieser Ergebnisse wählte ich folgende Hydrolysebedingungen:

Zur Freisetzung von Neutralzucker

Säurekonzentr.	Hydrolysebed.	Temp.
1N HCl	6 Std.	100°C

Zur Freisetzung von Neutralzucker

Säurekonzentr.	Hydrolysebed.	Temp.
2N HCl	4 Std.	80°C

Zur Freisetzung von Hexosaminen

Säurekonzentr.	Hydrolysebed.	Temp.
6N HCl	3 Std.	100°C

2.1.1. Saure Hydrolyse zur Freisetzung von Neutralzucker

Zu 10 mg Apoprotein gibt man in einer Glasampulle 5 ml 1N oder 2 N HCl. Die Glasampulle wird dann für 5 min. mit Stickstoff gespült und in flüssiger Luft eingefroren. Nach diesem Arbeitsschritt evakuiert man die Ampulle mit einer Hochvakuumpumpe und schmilzt sie über dem Gebläsebrenner zu. Die Evakuierung kann allerdings auch unterbleiben, ohne daß signifikante Zuckerverluste auftreten. Die Probe wird dann bei 80° bzw. 100° C 6 bzw. 4 h im Trockenschrank hydrolysiert. Aus den abgekühlten und geöffneten Ampullen überführt man das Hydrolysat zur Entfernung der Säure auf ein Säulchen (10 x 0,5 cm), das mit dem stark basischen Ionenaustauscher Dowex 1 x 8 (Acetat-Form) gefüllt ist. Nach zweimaligem Waschen des Ionenaustauschers mit je 5 ml Aqua dest. werden die vereinigten Eluate am Rotavapor auf ca. 1 ml eingeeengt. Zur Abtrennung der Aminosäuren und Peptide gibt man das Eluat über den stark sauren Ionenaustauscher Dowex 50 x 12 (H⁺-Form). Anschließend wird zweimal mit 4-5 ml Aqua dest. nachgewaschen. Die Zucker sind in dem Eluat enthalten und können nach dessen Einengung auf ca. 0,1 - 0,2 ml analysiert werden.

2.1.2. Saure Hydrolyse zur Freisetzung von Hexosaminen

Die Hydrolysen zur Hexosaminbestimmung mit 6N HCl bei 100° C über drei Stunden wurden nach obiger Arbeitsmethode durchgeführt. Es unterbleibt lediglich der vorletzte Arbeitsschritt, bei dem das Hydrolysat über den stark sauren Kationenaustauscher Dowex 50 x 12 gegeben wird. Die Analyse erfolgt dünnschichtchromatographisch oder mittels Aminosäureanalysator.

2.1.3. Saure Hydrolyse zur Freisetzung von Sialinsäure(41)

10 mg Apoprotein werden in einer Glasampulle mit 5 ml 0,1 N oder 0,05 N H_2SO_4 versetzt. Nach Abschmelzen der Ampulle hydrolysiert man bei 80° bzw. 90° C eine h. Das filtrierte Hydrolysat überführt man auf ein Säulchen (10 x 0,5 cm), das mit dem stark basischen Ionenaustauscher Dowex 1 x 8 (200-400 mesh) (Acetat-Form) 6 cm hoch gefüllt ist. Danach wäscht man zweimal mit je 5 ml Aqua dest. nach.

Die Sialinsäuren werden mit 8 ml 1N Essigsäure-Acetatpuffer pH 4,6 von der Säule eluiert.

Behandlung des Ionenaustauschers Dowex 1 x 8 (200-400 mesh) Cl⁻-Form:

Der Ionenaustauscher wird auf dem Dampfbad mit dem dreifachen Volumen 2N HCl erhitzt. Nach 30 min. dekantiert man. Dieser Prozess wird viermal wiederholt. Anschließend rührt man den Austauscher

in Aqua dest. ein und füllt ihn in eine mit Fritte oder Glaswollpfropfen versehene Säule. Es wird nun solange mit 2N Natriumacetatlösung gewaschen, bis das Eluat chloridfrei ist. Dann überführt man den Austauscher in 1N Essigsäure und nutsch auf dem Büchnertrichter ab.

3g des feuchten Austauschers werden im zweifachen Volumen Wasser suspendiert und in eine Säule (10 x 0,5 cm) ca. 6 cm hoch gefüllt. Auf das Harz legt man ein Filtrierpapierscheibchen und überschichtet 0,5 cm hoch mit Seesand. Nach Waschen des Austauschers mit 0,1N Essigsäure ist die Säule gebrauchsfertig.

2.2. Alkalische Hydrolyse mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$

10 mg der hydrolysierten Substanz werden mit 4ml einer 4%igen, wäßrigen Bariumhydroxydlösung unter Stickstoff in einer Glasampulle eingeschmolzen und 12 - 30 min. im Trockenschrank auf 100° C erhitzt. Nach Abkühlung und Öffnung der Ampulle überführt man das Hydrolysat in ein Zentrifugenglas und versetzt zur Neutralisierung mit 2N H_2SO_4 . Den dabei ausfallenden Bariumsulfat-Niederschlag zentrifugiert man ab, wäscht ihn zweimal mit 4 ml heißem Aqua dest., gibt Zentrifugat und Waschwasser zusammen und engt am Rotavapor auf 0,1-0,2 ml ein.

3. Dünnschichtchromatographische Methoden

3.1. Dünnschichtchromatographische Trennung der Zucker

Zur Dünnschichtchromatographie der Zucker werden Kieselgelschichten verwendet, die auf Aluminiumfolie im Format 10 x 20 erhältlich sind (Handelsbezeichnung: DC-Karten Si, Kieselgel, Fa. Riedel de Haen). Die gleichen Schichten sind auch mit Fluoreszenzindikator unter der Bezeichnung "DC-Karten SiF, Kieselgel" (Riedel de Haen) erhältlich. Für die Entwicklung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz eignen sich diese Dünnschichten jedoch nicht. In diesem Falle haben sich die kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien der Fa. Merck gut bewährt (DC-Alufolien Kieselgel 60 F 254).

Die Trennleistung der Kieselgelschichten konnte durch Imprägnierung mit 0,02M Natriumacetat-, 0,02M Borsäure-oder 0,02M Natriumboratlösung wesentlich verbessert werden (10).

Es empfiehlt sich, die Folien vor Gebrauch 30 min. bei 100° C im Trockenschrank zu aktivieren.

Durchführung:

Die Auftragung der Proben und Vergleichszucker erfolgt punktförmig 1 cm vom unteren Plattenrand entfernt, wobei die einzelnen Auftragungspunkte ca. 2 cm Abstand voneinander haben. Um möglichst kleine Durchmesser der Flecken zu erreichen, trägt

man mit fein ausgezogenen Kapillaren auf, die sich sehr gut aus Schmelzpunktbestimmungsröhrchen anfertigen lassen. Die Auftragsmenge wird von Fall zu Fall neu festgelegt. Bei mehrmaligem Auftragen wird der entsprechende Fleck nach jeder Applikation mit einem Fön getrocknet.

Zur Trennung stellt man die Chromatogramme in DESAGA-Chromatographiegefäße, deren Boden etwa 0,5 cm hoch mit dem entsprechenden Fließmittel gefüllt ist. Es eignen sich folgende Fließmittel:

1. n-Butanol/Eisessig/Diäthyläther/Wasser (9:6:3:1
v/v)
2. Aceton/Wasser (90:10 v/v)
3. n-Butanol/Äthanol/Wasser (50:30:20 v/v)
4. Pyridin/Äthylacetat/Eisessig/Wasser (5:5:1:3 v/v)

Um eine exakte Trennung zu erreichen, ist es zweckmäßig, die Mehrfachchromatographie anzuwenden. Dazu wird nach dem ersten Lauf das Chromatogramm aus der Kammer genommen, getrocknet und nochmals in gleicher Richtung unter Verwendung des gleichen oder eines anderen Fließmittels getrennt. Nach dieser Methode lassen sich Galaktose und Glucose in den Fließmitteln 3 (erster Lauf) und 2 (zweiter Lauf) sehr gut trennen. Die Trenndauer beträgt bei einer Laufhöhe von 15 cm für beide Läufe ca. 5 h. Die Trennung der Aminos Zucker erfolgt im Fließmittel 4. Es genügt ein einmaliger Lauf bei einer Laufhöhe von 15 cm. Nach der Trennung werden die Chromatogramme sorgfältig getrocknet und entwickelt.

3.2. Dünnschichtchromatographische Trennung der Oligo- bzw. Polysaccharidketten

Zur Untersuchung der Oligo- bzw. Polysaccharidketten können die bereits oben aufgeführten kieselgelbeschichteten Folien verwendet werden. Als Fließmittel kommen in Frage: n-Butanol/Ameisensäure/Wasser 33:50:1 (v/v) oder n-Propanol/Wasser 85:15 (v/v) (10).

3.3. Vergleichszucker für die chromatographische Zuckertrennung

Zum Vergleich stellt man sich einprozentige Lösungen der Zucker in Aqua bidest. her. Sie werden im Kühlschrank eingefroren aufbewahrt und alle 3 Monate erneuert.

Folgende Vergleichszucker wurden eingesetzt:

D-(+)-Galaktosamin HCl	(Lieferant Serva)
D-(+)-Glucosamin HCl	(")
D-Fucose	(")
D-(+)-Xylose	(Lieferant Merck)
L-(+)-Arabinose	(")
D-(+)-Mannose	(")
D-(+)-Glucose	(")
D-(+)-Galaktose	(")
L-(+)-Fructose	(")
L-(-)-Sorbitose	(")
D-(-)-Ribose	(")

4. Entwicklung der Chromatogramme

Die Entwicklung der Chromatogramme wurde mit Anilinphthalat-Sprühareagenz (Merck), mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und mit Anthron-Sprühareagenz für den speziellen Nachweis von Ketosen durchgeführt. Die Aminosucker sind zusätzlich mit dem ELSON-MORGAN-Test nachweisbar.

4.1. Anilinphthalat-Sprühareagenz (Lieferant Merck)

Nach dem Besprühen werden die Chromatogramme bei 105° C im Trockenschrank 10 min. entwickelt. Die Zucker treten als braune Flecken in Erscheinung. Im UV-Licht zeigen sie eine kräftige gelb-grüne Fluoreszenz. Die Färbung und Fluoreszenz ist bei den Ketosen schwächer als bei den Aldosen. Die Zuordnung der Zucker in den Hydrolysaten erfolgt über die R_f -Werte an Hand der Vergleichszucker.

4.2. Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz

Man stellt jeweils eine frisch bereitete Lösung von 0,5 ml Anisaldehyd, 9 ml Äthanol (96%), 0,5 ml konz. Schwefelsäure und 0,1 ml Eisessig her (11). Nach dem Besprühen werden die Chromatogramme 5 - 10 min. auf 90° - 100° C erhitzt. Dieses Reagenz ergibt mit den Zuckern folgende charakteristische Farben:

Galaktose	-grün-grau
Glucose	-hellblau

Fructose	-violett
Mannose	-hellbraun
Arabinose	-gelbgrün
Sorbose	-violett
Ribose	-blau
Xylose	-grau

Das Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz ist äußerst empfindlich. Die Erfassungsgrenze liegt unterhalb von 0,05 μ g. Auf Schichten, die mit Borsäure imprägniert sind, erhält man mit diesem Entwickler keine guten Ergebnisse.

4.3. Anthron-Sprühareagenz

Mit diesem Reagenz ist ein spezifischer Nachweis für Ketosen möglich (42).

0,3 g Anthron werden in 10 ml Eisessig gelöst und 20 ml Äthanol, 3 ml Phosphorsäure (85%) und 1 ml Aqua dest. zugesetzt.

Diese Lösung ist im Kühlschrank einige Wochen haltbar. In der Kälte wieder ausfallendes Anthron wird durch kurzes Erwärmen in Lösung gebracht. Nach dem Besprühen erhitzt man die Chromatogramme 5 - 6 min. auf 110° C. Ketosen und Ketosen enthaltende Oligosaccharide erscheinen als gelbe Flecken.

4.4. ELSON-MORGAN-Test

Sprühlösung I:

0,5 ml einer Mischung aus 5 ml Kalilauge (50% in Aqua dest.) und 20 ml Äthanol abs. werden unmittelbar vor Gebrauch mit 10 ml einer Mischung

aus 0,5 ml Acetylaceton und 50 ml n-Butanol zusammengegeben. Die Lösung muß stets frisch bereitet werden.

Sprühlösung II:

1g 4-Dimethylaminobenzaldehyd löst man in 30 ml Äthanol und versetzt mit 30 ml Salzsäure (36%).

Bei Bedarf wird mit 180 ml n-Butanol verdünnt.

Nach Besprühen mit Lösung I erhitzt man das Chromatogramm 4 min. auf 105°C , besprüht mit Lösung II und trocknet 5 min. bei 90°C .

Die Aminosucker erscheinen als hellrot gefärbte Flecken. Unter der UV-Lampe zeigen sie hellblaue Fluoreszenz. Einfache Monosaccharide reagieren nicht.

5. Sialinsäurebestimmung

5.1. Thiobarbitursäure-Test (44)

Für diesen Test sind folgende Reagenzien bereitzustellen:

- a. Perjodatlösung: Es wird eine 0,025 M Perjodatlösung mit 0,125 N H_2SO_4 hergestellt.
- b. Natriumarsenitlösung: 2%ige Lösung von Natriumarsenit in 0,5 N HCl
- c. Thiobarbitursäure-Lösung: Herstellung einer 0,1 N Lösung von 2-Thiobarbitur-

säure in Aqua dest., die mit Natronlauge auf pH 9,0 eingestellt wird.
(Haltbar in dunkler Flasche bei 4°C etwa 1 Monat).

d. Saures Butanol: n-Butanol enthaltend 5% (v/v)
12 N HCl

Durchführung:

0,5 ml der auf Sialinsäure zu testenden Lösung versetzt man mit 0,25 ml Perjodatlösung und erwärmt im Wasserbad auf 37° C. Der Überschuß an Perjodat wird mit 0,2 ml Natriumarsenitlösung reduziert. Sobald die gelbe Farbe des freigesetzten Jodes verschwunden ist, setzt man 2 ml Thiobarbitursäurelösung zu, verschließt das Reaktionsgefäß und erhitzt dieses 5 min. im siedenden Wasserbad. Die gefärbte Lösung kühlt man anschließend in Eiswasser ab und schüttelt mit 5 ml Säure-Butanol aus. Die Trennung beider Phasen wird durch kurze, scharfe Zentrifugation erleichtert. Die Farbintensität (Rotfärbung) der organ. Phase mißt man mit einem Spektrophotometer bei 549 nm.

5.2. Alkali-EHRLICH-Methode (43)

Folgende Reagenzien sind bereitzustellen:

a. Borat-Puffer pH 8,5 : 0,2 M Borsäurelösung
wird mit Natriumhydroxydlösung auf pH 8,5 eingestellt.

b. Ehrlich-Reagenz: 1,33%ige Lösung von
p-Dimethylaminobenzaldehyd in
95%igem Äthanol p.a./HCl konz.
(1:1; v/v)-Lösung

c. 95%iges Äthanol

Durchführung:

Zu 0,5 ml der auf Sialinsäure zu testenden Probe gibt man 0,5 ml 0,2M Boratpuffer pH 8,5. Die Lösung wird für 45 min. auf 100° C erhitzt und danach abgekühlt. Man versetzt mit 3 ml 95%igem Äthanol und 1 ml EHRLICH-Reagenz. Diese Lösung wird 20 min im geschlossenen Gefäß auf 70° C erhitzt, um die Farbe zu entwickeln. Sofort nach dem Abkühlen mißt man die Extinktion bei 558 nm (violette Farbe).

5.3. Resorcin-Methode (19)

Reagenz: Man löst 0,2 g Resorcin p.a. in 10 ml Aqua dest., versetzt mit 80 ml konz. HCl und 0,25 ml 0,1 M Kupfersulfatlösung und füllt mit Aqua dest. auf 100 ml auf.

Durchführung:

2 ml der auf Sialinsäure zu testenden Lösung gibt man in ein Zentrifugenglas und fügt 2 ml Resorcin-Reagenz hinzu. Das Glas wird 15 min auf einem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung unter fließendem Wasser werden 5 ml Isoamylalkohol

zugegeben und kräftig geschüttelt. Das Glas wird dann in Eiswasser abgekühlt (ca. 10 min.). Nach dem Zentrifugieren überführt man die organische Phase in eine Küvette und mißt die Extinktion bei 450 und 580 nm.

6. Quantitative Zuckerbestimmung nach DUBOIS (20)

2 ml der auf Zucker zu testenden Lösung versetzt man mit 0,05 ml einer 80%igen (g/g) wäßrigen Phenollösung und fügt in raschem Strom 5 ml konz. Schwefelsäure hinzu. Dabei muß auf eine gute Durchmischung der Reaktionslösung geachtet werden. Nach 10 min. stellt man die Küvette für 20 min. in ein auf 25-30° C temperiertes Wasserbad. Die Absorption der charakteristisch gelb-orangen Farbe wird für Hexosen bei 490 nm, für Pentosen und Uronsäuren bei 480 nm gemessen.

Die Farbe ist einige Stunden stabil.

Dieser Versuchsansatz kann nach Bedarf folgendermaßen abgewandelt werden:

Zu 1ml Probelösung gibt man 1 ml 5%ige Phenollösung in Aqua dest. und 5 ml konz. Schwefelsäure. Die weiteren Arbeitsschritte bleiben unverändert. Für quantitative Messungen müssen Testlösungen verschiedener Zuckerkonzentrationen zur Erstellung einer Eichkurve vorbereitet werden.

7. Quantitative Aminosäureanalyse

Die quantitativen Aminosäureanalysen wurden mit dem automatischen Aminosäureanalysator Multichrom 4255 - Flüssigkeitssäulenchromatograph (Beckmann) durchgeführt. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit des Gerätes erfolgte der Einbau einer 16 mm Durchflußküvette. Dadurch wurde die Nachweisgrenze in den Nanomolbereich verschoben. Die Durchführung der Analysen geschah nach der Bedienungsanleitung des Geräteherstellers (45).

Zur Durchführung der quantitativen Untersuchungen an Hydrolysaten des Apoproteins wurde das 2-Säulen-Verfahren angewendet. Die quantitative Auswertung der Glykopeptidhydrolysate erfolgte unter Verwendung des 1-Säulen-Verfahrens, da nur sehr wenig Probenmaterial zur Verfügung stand. Die Aminosäurepeaks wurden nach dem Vergleichschromatogramm eines Testgemisches bestimmten Aminosäuren zugeordnet. Durch automatische Integration des jeweiligen Peak-Flächeninhaltes waren die einzelnen Aminosäureanteile quantitativen Berechnungen zugänglich. Voraussetzung für diese Berechnungsmethode ist allerdings eine ruhige, exakte Basislinie.

Bei der Auswertung der Aminosäureanalysen der Glykopeptide versagte in zahlreichen Fällen die automatische Integration, da durch die kleinen Peaks

die Peak-Erkennung des Integrators unterschritten wurde. Daher erfolgte hier die manuelle Auswertung nach der HxW-Methode (= Höhe x Breite).

8. Darstellung der Glykopeptide

Für die Darstellung von Glykopeptiden ist ein intensiver enzymatischer Abbau des Apoproteins notwendig. Diese enzymatische Hydrolyse wurde mit dem Enzym Pronase E aus *Streptomyces griseus* durchgeführt.

8.1. Enzymatische Hydrolyse mit Pronase E aus Streptomyces griseus (46)

Das Enzym ist im Grund kein einheitliches Enzym sondern ein Enzymgemisch, bestehend aus Endo- und Exopeptidasen. Daher werden die Bindungen in Proteinen völlig unspezifisch angegriffen. Manche Präparate enthalten geringe kohlenhydrathaltige Verunreinigungen. Diese können jedoch durch Acetonfraktionierung entfernt werden. (47)

25 mg Protein werden mit 1 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7,8 oder Aqua dest. gelöst bzw. suspendiert. Wird es nur in dest. H_2O gelöst bzw. suspendiert, muß der pH-Wert öfters auf 7,8 eingestellt werden. Die Lösungen müssen außerdem zur Aktivierung des Enzyms 0,0015-0,015 M Calciumchlorid enthalten. Die Pronase gibt man in einem Anteil von etwa 0,5 -1% der Proteineinwaage zu. Die Reaktions-

temperatur soll möglichst 37°C betragen. Die Analyse ist nach ca. 96-120 h beendet. Während der Hydrolyse erfolgen in etwa gleichen Zeiträumen 1-2mal weitere Enzymzugaben.

Nach Beendigung der Hydrolyse wird das Hydrolysat ca. 30 min. auf 100° C erhitzt, um die Pronase durch Hitzedenaturierung auszufällen. Danach zentrifugiert man ab und dampft das Zentrifugat am Rotavapor ein. Der Rückstand wird mit 0,5-1 ml 0,1 N Essigsäure aufgenommen.

8.2. Auftrennung des enzymatischen Hydrolysates an

Sephadex G 25

Das mit 0,1N Essigsäure aufgenommen Hydrolysat chromatographiert man an Sephadex G 25 medium. Dazu füllt man eine Säule (1,30 x 1 cm) mit in 0,1 N Essigsäure gequollenem Sephadex G 25 medium und äquilibriert mit Essigsäure gleicher Konzentration bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 2,5 ml/h mittels einer LBK-Varioperper-Pumpe ca. 48 h. Danach gibt man das Hydrolysat auf die Säule. Die Elution erfolgt unter gleichen Bedingungen wie die Äquilibriumierung.

Während dieses Vorgangs registriert ein Durchflußphotometer (UVICORD LBK 4701 A mit LBK 6520 A Fallbügelschreiber) bei 255 nm den Verlauf der Elution.

Es werden jeweils 2,5 ml Fraktionen aufgefangen und nach dem Verfahren von DUBOIS (20) auf ihren Zuckergehalt überprüft. Dazu entnimmt man 0,2 ml Eluat, versetzt mit 0,005 ml 80%iger Phenollösung und 2 ml konz. Schwefelsäure. Eine auftretende gelb-orange Färbung zeigt das Vorliegen von Zuckern in den jeweils untersuchten Fraktionen an. Zusätzlich kann man die Extinktion bei 485 nm messen.

Die glykopeptidhaltigen Fraktionen werden zusammengegeben, auf einen Milliliter eingengt und nochmals an Sephadex G 25 rechromatographiert. Nach Entfernung des Elutionsmittels wird das getrocknete Glykopeptidmaterial im Kühlschrank aufbewahrt.

8.3. Zweidimensionale Auftrennung der Glykopeptidfraktionen auf Dünnschichtplatten (G 1500)

2 mg des Glykopeptidgemisches löst man in 0,2 ml Aqua dest. Aufgetragen werden maximal 0,5 mg Peptidgemisch und zwar so, daß der Substanzfleck 9 cm vom linken Plattenrand, der Anodenseite, und 2 cm vom unteren Plattenrand entfernt liegt. Zur Kontrolle der Wanderungsgeschwindigkeit dient ein kleiner Tropfen Pikrinsäure, der 8 cm vom linken und 1 cm vom unteren Plattenrand appliziert wird. Nach Trocknung der Flecken besprüht man die Platte mit Pyridin-Acetat-Puffer pH 6,5 (90 ml Pyridin + 10 ml Eisessig + 900 ml Wasser) bis zur guten Durchfeuchtung. Die Platten befreit man anschließend

unter Auslassung der Startflecken durch Auflegen von Fließpapier vom Pufferüberschuß. Zur Elektrophorese wurde das CAMAG HVE - Gerät benutzt.

Die DC-Platten orientiert man in der Elektrophorese-Kammer so, daß der Pikrinsäurefleck auf der Anodenseite liegt. Über zwei mit Elektrophoresepuffer getränkte Fließpapiere steht die Platte mit den seitlichen Puffertrögen in Stromkontakt. Die Apparatur wird durch Umlaufkühlung auf 0°C einreguliert.

Zu Beginn der Auftrennung legt man zunächst für 5 min. eine Spannung von 500 V an. Dadurch wird eine Entfernung der im Peptidgemisch vorhandenen Salze erreicht. Anschließend erhöht man die Spannung auf 1000 V an. Nach ca. 90 min. bricht man die Trennung ab. Die Pikrinsäure ist während dieser Zeit 6 - 7 cm anodenwärts gewandert. Im Anschluß an die Elektrophorese werden die Platten bei 100°C 30 min. getrocknet. Für die Chromatographie in der zweiten Dimension stellt man die Platten in eine DESAGA-Chromatographie-Kammer, die 0,5 cm hoch mit dem Fließmittel Pyridin/n-Butanol/Eisessig/H₂O (100:170:35:62; v/v) gefüllt ist. Eine Laufhöhe von 12 cm erfordert 4 h. Nach Abbruch der Trennung wird wiederum 30 min. bei 100°C getrocknet.

Zur Sichtbarmachung der Glykopeptide gibt man die Platten 15 min. in eine Chromatographiekammer, auf

deren Boden eine Petrischale mit konz. HCl steht. Es empfiehlt sich, die Platten kurz vor diesem Arbeitsschritt über kochendem Wasser zu dämpfen. Anschließend besprüht man mit Anilinphthalat und entwickelt 10 min. bei 105° C im Trockenschrank. Die Glykopeptide sind entweder an der Braunfärbung oder der grün-gelben Fluoreszenz unter dem UV-Licht zu erkennen und zu lokalisieren. Unter standardisierten Bedingungen können sie durch Abschaben von den Platten isoliert werden. Das abgeschabte Material füllt man in 10 cm lange Mikroskälchen (0,2 cm ϕ), deren konische Enden mit Glaswollpfropfen versehen sind. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml/h eluiert man die entsprechenden Glykopeptide entweder mit Aqua dest. oder 0,1 N Essigsäure.

8.4. Überprüfung der isolierten Glykopeptide auf Einheitlichkeit

Von den isolierten Peptiden wird eine geringe Menge zur Überprüfung ihrer Einheitlichkeit entnommen, mit Elektrophoresepuffer versetzt und rechromatographiert. Die Arbeitsweise verläuft entsprechend der zweidimensionalen Auftrennung der Glykopeptidfraktion. Die Entwicklung erfolgt jetzt mit Ninhydrin. Ein einzelner Ninhydrinfleck zeigt die Reinheit, seine Lage die Identität mit der isolierten Probe an.

8.5. Hydrolyse der isolierten Glykopeptide

Die präparative Trennung der Glykopeptide von den DC-Platten führt naturgemäß nur zu sehr geringen Mengen. Zu ihrer weiteren Charakterisierung in der quantitativen Aminosäureanalyse müssen sie hydrolytisch gespalten werden.

Für die hydrolytische Spaltung wird 5,7 N konstant siedende HCl verwendet. Man nimmt das getrocknete Peptidmaterial mit 0,5 ml 5,7 N HCl auf und überführt es in Hydrolyseröhrchen. Diese begast man vorsichtig (Vermeidung von Schaumbildung) 5 min. mit Stickstoff. Gegen Ende der Stickstoffbegasung werden die Röhrchen in flüssiger Luft abgekühlt, evakuiert und abgeschmolzen. Die Hydrolyse führt man im Trockenschrank bei 110° C über 18 h durch. Aus dem abgekühlten, geöffneten Röhrchen wird die HCl im evakuierten Exsikkator über festem KOH entfernt. Dabei benötigt man Temperaturen um 0° C, um Nebenreaktionen der Zucker mit Aminosäuren zu vermeiden. Die Proben werden danach mit 1 ml Probenverdünnungspuffer pH 2,2 aufgenommen und bis zur Analyse im Kühlschrank eingefroren.

9. Dansylierung und Trennung der dansylierten Aminosäuren (27)

Man nimmt das eingedampfte Hydrolysat mit 0,01 ml 0,2M NaHCO_3 -Lösung auf und trocknet nochmals im Vakuum ein. Anschließend setzt man 0,01 ml Aqua bidest. und 0,01 ml Dansylchloridlösung (2,5 mg/ml in Aceton) hinzu. Das Reaktionsgefäß wird verschlossen und 1 h bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

Danach entnimmt man dem Ansatz eine kleine Menge mit einer möglichst fein ausgezogenen Glaskapillare (leicht herzustellen aus Schmelzpunktbestimmungsröhrchen) und trägt in die Ecke einer 3 x 3 cm großen, doppelbeschichteten Polyamidfolie (F 1700) punktförmig auf. Gleichzeitig appliziert man auf der anderen Seite zusätzlich ein Referenzgemisch von 18 Dansyl-Aminosäuren.

Als Fließmittel werden die von WOODS und WANG (48) angegebenen Systeme verwendet.

Die Chromatographie erfolgt in 2 Dimensionen. Das Fließmittel der ersten Dimension besteht aus Wasser und Ameisensäure (100:1,5; v/v), das der zweiten Dimension aus Benzol und Eisessig (9:1; v/v).

Die Identifizierung der Dansyl-Aminosäuren erfolgt bei UV-Strahlung im Durchlicht aufgrund übereinstimmender Lage von Fluoreszenzflecken gegenüber dem Referenzgemisch.

10. Inkubationsbedingungen der Glykosidasen

10. 1. α -Glucosidase

Das Enzym spaltet optimal bei pH 6,6-7. Man gibt zu 1mg Glykopeptidmaterial 1 ml 0,1 M Acetat-Puffer pH 6,6 und 0,01 ml (= 1U) α -Glucosidase-Suspension. Die enzymatische Hydrolyse wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach 2 h testet man den Reaktionsansatz auf freie Glucose.

0,1 M Acetat-Puffer pH 6,6: 1,36 g Natriumacetat x $3H_2O$ werden in 80 ml Aqua bidest. gelöst, mit 0,1 N Essigsäure auf pH 6,6 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

10.2. α -1.4.- α -1.6-Amyloglucosidase:

Amyloglucosidase spaltet optimal bei pH 4,8 und 40° C.

1 mg Glykopeptidmaterial gibt man in 1 ml 0,2 M Acetat-Puffer pH 4,8 und setzt 0,01 ml (= 1,4 U) Amyloglucosidase-Suspension hinzu. Nach 2 h erfolgt der Test auf freie Glucose.

Es ist empfehlenswert, den Reaktionsansatz von Zeit zu Zeit zu schütteln.

0,2 M Acetat-Puffer pH 4,8 : 1,64 g Natriumacetat werden in 50 ml Aqua bidest. gelöst und 0,48 ml 96%ige Essigsäure hinzugegeben. Danach füllt man auf 100 ml auf.

10.3. α -Amylase

Das Enzym spaltet optimal im Bereich von pH 7 und wird durch Chloridionen aktiviert.

zu 1 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,9 der 0,01 M an NaCl ist, gibt man 1 mg Glykopeptidmaterial und inkubiert 0,02 ml (= 200 U) α -Amylase-Suspension. Die Reaktionsdauer beträgt 2 h bei Zimmertemperatur.

0,02 M Phosphatpuffer pH 6,9 : 0,194 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,123 g KH_2PO_4 wurden in 80 ml Aqua bidest. gelöst, 6,5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung hinzugegeben, mit 0,1 N NaOH auf pH 6,9 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

10.4. β -Amylase

Das Enzym spaltet optimal bei pH 4,8.

Zu 1 mg Glykopeptidmaterial gibt man 0,5 ml Aqua bidest. und 0,5 ml Acetat-Puffer pH 4,8.

Die Lösung temperiert man auf 25°C und inkubiert 0,01 ml (= 1U) Enzymsuspension. Nach 2 h ist die Hydrolyse beendet.

10.5. β -Glucosidase

Das Enzym spaltet optimal in einem pH-Bereich von 5,6 - 6,4. Man gibt zu 1 mg Glykopeptidmaterial 1 ml 0,1 M Acetat-Puffer pH 6,0 und 0,01 ml (=2U) β -Glucosidase-Suspension. Die enzymatische Hydrolyse wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach 2 h erfolgt der Test auf Glucose.

10.6. β -Galaktosidase

β -Galaktosidase hat ein flaches pH-Optimum, das von der Art des verwendeten Puffers und von den zugesetzten Ionen abhängig ist. Alkali-Ionen sind für die Aktivität notwendig: Mg^{2+} -Ionen führen zu einer Steigerung der Aktivität (49).

Zu 1 ml 0,1 M Pyrophosphat-Puffer pH 7,5 gibt man 1 mg Glykopeptidmaterial 0,03 ml 0,1 M Magnesiumsulfatlösung und 0,01 ml (= 1,5U)

β -Galaktosidase - Suspension. Die enzymatische Spaltung erfolgt bei Zimmertemperatur. Sie ist nach 2 h beendet. 0,1 M Pyrophosphat-Puffer pH 7,5 : 2,7 g Natriumpyrophosphat löst man in ca. 60 ml Aqua bidest., gibt 0,1 N HCl hinzu bis bis pH 7,5 erreicht ist und füllt auf 100 ml auf.

11. Glucose-Bestimmung mit Glucose-Oxydase und Peroxydase (49)

- a. Puffer-Enzym-Gemisch: 0,12M an Phosphat, pH 7:
2,07g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, 1,09g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$,
38 mg Glucose-Oxydase und 6 mg Peroxydase
werden mit Aqua bidest. zu 150 ml gelöst.
- b. Guajakol-Reagenz: 280 mg Guajakol p.a. werden
zu 100 ml gelöst.

c. Glucose-Nachweisreagenz: Unter kräftigem Rühren gibt man zu 50 ml Lösung a. 0,5 ml Lösung b. Das Nachweisreagenz wird in dunkler Flasche im Kühlschrank aufbewahrt. Es sollte möglichst täglich frisch angesetzt werden. Die Haltbarkeit wird durch Zusatz einiger Tropfen Chloroform erhöht.

Zur qualitativen Glucose-Bestimmung wird zu der jeweils zu testenden Probe 1 ml Nachweisreagenz gegeben und die Extinktionsänderung an einem Spektrophotometer bei 436 nm registriert.

12. Galaktose-Bestimmung mit Galaktose-Dehydrogenase

(49)

a. Puffer-NAD⁺-Lösung: 0,04 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,6 (0,4856 g/100 ml), 0,004 M neutrales Glutathion (0,1229 g/100 ml) und 0,0004 M NAD⁺ (0,02653 g/100 ml) werden zu 100 ml gelöst.

b. Enzym: 0,03 ml Enzym-Suspension

Zu 1 ml Puffer-NAD⁺-Lösung (a) in einer Küvette gibt man 0,03 ml Galaktose-Dehydrogenase (b) Nach Temperierung auf 30°C fügt man 1 ml der zu testenden Probe hinzu. Die Extinktionsänderung wird bei 340 nm registriert.

13. Affinitätschromatographie an Concanavalin

A-Sepharose (50)

Man füllt eine Säule (15 x 0,8 cm) mit Con A-Sepharose und eluiert zur Entfernung eventuell vorhandenen Eiweißes mit 10 ml Methyl- α -D-glucopyranosid-Lösung (50 mg/ml in 1%iger Natriumdesoxycholat-Lösung). Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt etwa 8 ml/h. Anschließend äquilibriert man die Säule über mehrere Stunden mit 1 %iger Natriumdesoxycholat-Lösung.

1 mg D-Oxynitrilase (Holoenzym), an Sephadex G 25 fine entsalzt, wird mit 1%iger Desoxycholat-Lösung aufgenommen und auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgt mit Cholat-Lsg. Glykoproteine mit endständigen α -glykosidisch gebundenen Mannose- oder Glucoseresten präzipitieren, d.h. sie werden auf der Säule festgehalten. Alle anderen Proteine werden mit Desoxycholat-Lösung eluiert. Die Ablösung der festgehaltenen Proteine erfolgt mit 2%iger Methyl- α -D-glucopyranosid-Lösung in 1%iger Natriumdesoxycholatlösung.

Zur Registrierung des Elutionsverlaufes kann ein Durchflußphotometer mit angeschlossener Meß- und Registriereinheit benutzt und die Absorption des Eluats bei 255 nm gemessen werden.

14. Bezugsquellen der verwendeten Materialien

Ausgangsmaterial für die Isolierung von D-Oxynitrilase war entfettete Kleie von *Prunus amygdalus* var. *sativa* der Firma AoK Exterikultur GmbH 6552 Münster am Stein.

DEAE (-32)-Ionenaustauscher wurde bezogen von Whatmann (London), Sephadex G 100, G 25 und Con A - Sepharose 4B von Pharmacia (Uppsala).

α -Glucosidase, β -Glucosidase, α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase, β -Galaktosidase, α -Amylase, Glucose-Oxydase, Peroxydase, β -Galaktose-Dehydrogenase wurden von Boehringer (Mannheim), β -Amylase, Pronase E und Neuraminidase von Merck (Darmstadt) erhalten.

Von der Fa. Schleicher & Schüll (Dassel) wurden DC-Fertigplatten G 1500, G 1505, LS 254 und F 1700 FF (jeweils 20 x 20 cm) von Riedel de Haen (Seelze) DC-Aluminiumfolien Si und SiF (10 x 20 cm) und von Merck DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F 254 (20 x 20 cm) bezogen.

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren handelsübliche pro analysi Substanzen.

Literaturverzeichnis

=====

- 1) KROMBHOLZ, F.: Staatsexamensarbeit (Marburg) 1966
- 2) GOTTSCHALK, A. et al.: Nature 194, 1051 (1962)
- 3) LAMPORT, D.T.A.: Nature 216, 1322 (1967)
LAMPORT, D.T.A.: Biochemistry 8, 1155 (1969)
- 4) GOTTSCHALK, A., KÖNIG, W.: Biochim. Biophys. Acta
158, 358 (1968)
- 5) MEHNER, K.H.: Staatsexamensarbeit (Marburg) 1971
- 6) GERSTNER, E.: Dissertation (Marburg) 1971
- 7) ASCHOFF, H.J.: Dissertation (Marburg) 1968
- 8) GOTTSCHALK, A.: Glycoproteins, Elsevier (Amsterdam)
1972
- 9) MÄTZKE, V.: mündliche Mitteilung, Dissertation in
Vorbereitung
- 10) STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie, Springer
(Berlin) 1959
- 11) STAHL, E., KALTENBACH, H.: J. Chromatogr. 5, 351 (1961)
- 12) SASLAW, D., WARAVDEKAR, V.S.: Arch. Biochem. Biophys. 90,
245 (1960)
- 13) ELSON, L.A., MORGAN, W.T.I.: Biochem. J. 27, 1924 (1933)
MORGAN, W.T.I., ELSON, L.A.: Biochem. J. 28, 988 (1934)
- 14) WARREN, L.: Comp. Biochem. Physiol. 10, 153
(1963a)
- 15) MAYER, F.C., DAM, R. and PAZUR, H.I.: Arch. Biochem.
Biophys. 108, 356 (1964)
- 16) ONODERA, K., HIRAND, S. and HAYASHI, H.: Agr. Biol. Chem.
30, 1170 (1966)
- 17) GIELEN, W.: Z. Naturforschung 23b, 1598 (1968)
- 18) AMINOFF, D.: Biochem. J. 81, 384-391 (1961)
- 19) SVENNERHOLM, L.: Acta Chem. Scand. 12, No 3 (1958)
- 20) DUBOIS, M. et al.: Anal. Chem. 28, 350-356 (1956)

- 21) DAWSON, G., CLAMP, I.R.: Biochem. Biophys. Res
Commun. 26, 341-358 (1967)
Biochem. J. 107, 352 (1968)
- 22) KUHN, R., LÖW, J.: Chem. Ber. 74, 219 (1941)
- 23) ISBELL, S.U.: Ann. Rev. Biochem. 12, 215
(1943)
- 24) PHOTAKI, J.: J. Am. Chem. Soc. 85, 1123
(1963)
- RILEY, G., TURNBULL, J.H. and WILSON, W.:
J. Chem. Soc., 1373 (1957)
- 25) TANAKA, K., BERTOLINI, M., PIGMAN, W.:
Biochem. Biophys. Res. Commun.
16, 404 (1964)
- 26) RANDERATH, K.: Dünnschichtchromatographie,
Verlag Chemie (Weinheim) 1965
- 27) GRAY, W.R., HARTLEY, B.S.: Biochem. J. 89, 59 (1963)
Biochem. J. 89, 379 (1963)
- 28) NEUHOFF, V. et. al.: Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.
350, 121-128 (1969)
- 29) NOMONTO, M., NARAHASHI, Y., MURAKAMI, M.:
J. Biochem. 48, 593 (1960)
- 30) KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Thieme-Verlag Stuttgart 1967
- 31) GOLDSTEIN, J., HOLLERMAN, C.E., MERRICK, J.M.:
Biochim. Biophys. Acta 97,
68-76 (1965)
- 32) GOLDSTEIN, J., HOLLERMAN, C.E., SMITH, E.E.: Biochemistry 4,
876-883 (1965)
- 33) KUNDEL, M.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1974
- 34) GERSTNER, E.: mündliche Mitteilung
- 35) WOOLEN, W.J., HEYWORTH, R. and WALKER, P.G.:
Biochem. J. 78, 111 (1961)
Biochem. J. 79, 294 (1961)

- LEE, Y.C., WU, C.-Y. and MONTGOMERY, R.: Biochem.
J. 91, 9c (1964)
- 36) GINSBURG, V.: Advan. Enzymol. 26, 35 (1964)
- 37) ROSEMAN, S.: in Biochemistry of Glycoprotein
and Related Substances, Cystic
Fibrosis (Mucoviscidosis),
ROSSI, E. and STOLL, E. (Eds.),
Karger (Basel-New-York)(1968)
244
- 38) GOTTSCHALK, A.: Nature 222, 452 (1969)
- 39) EYLAR, E.H.: J. Theor. Biol. 10, 89 (1965)
- 40) WINTERBURN, P.J., PHELBS, C.F.: Nature 236, 147 (1972)
- 41) SVENNERHOIM, L.: Acta Chem. Scand. 12, No 3
(1958)
- 42) JOHANSON, R.: Nature 172, 956 (1953)
- 43) BELCHER, R. et al.: Analyst 79, 201 (1954)
- 44) AMINOFF, D.: Biochem. J. 81, 384-385 (1961)
- 45) BECKMAN Instruments, Bedienungsanleitung zum Multi-
chrom Flüssigkeits-Säulen-
chromatographen, München o.J.
- 46) HIRAMATSU, A., OUCHI, T.: J. Biochem. (Tokyo) 54, 462
(1963)
- 47) NOMOTO, M., NARAHASHI, Y.: J. Biochem (Tokyo) 46, 653
(1959)
- 48) WOODS, K.R., WANG, W.T.: Biochim. Biophys. Acta 42,
177 (1967)
- 49) BERGMAYER, H.U.: Methoden der enzymatischen
Analyse Band I, 2. Auflage
(1970), Verlag Chemie,
Weinheim/Bergstraße
- 50) ALLAN, D., AUGER, I. and CRUMPTON, M.J.: Nature 236, 23
(1972)

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Emanuel Pfeil,
danke ich vielmals für die Unterstützung und sein
stetes persönliches Interesse bei der Durchführung
dieser Arbeit.

Lebenslauf

=====

17. 9. 1944 geboren in Geisa, Kreis Bad Salzungen/Thüringen
als Sohn des Bundesbahnbeamten Otto Haas und
seiner Ehefrau Gertrud geb. Henkel
- 1951 - 1955 Besuch der Volksschule Hofbieber, Kreis Fulda
- 1955 - 1964 Besuch des Freiherr-v.-Stein Gymnasiums in
Fulda
- 1964 - 1965 Ableistung des Wehrdienstes
- 1965 - 1972 Studium der Chemie und Biologie an der
Philipps-Universität Marburg
20. 6. 1972 Staatsexamen in Chemie und Biologie
1. 10.1972 Beginn der vorliegenden Dissertation am Fach-
bereich Chemie in Marburg unter der Leitung
von Herrn Prof. Dr. E. Pfeil
- seit
27. 3. 1971 verheiratet mit der Lehrerin Lucia Herr
6. 6. 1975 Geburt der Tochter Susanne

Meine akademischen Lehrer waren:

Buchholz, Cleffmann, Dimroth, Düker, Franke, Follmann,
Geyer, Kamke, Kellner, Kessel, Koch, Koecke, Kuhn, Lenski,
Lüdtke, Mahr, Maier, Matthes, Nultsch, Perst, Pfeil, Schmid,
Scriba, Seidel, Seidelmann, Seitz, Senger, v. Stosch,
Walcher, Witzel

